



Uniwersytet Warszawski Wydział Biologii

Oskar Siemianowski

**Mechanizmy zmiany pobierania, dystrybucji i tolerancji na cynk
i kadm w wyniku ekspresji *AtHMA4* w tytoniu**

rozprawa doktorska

Promotor rozprawy
prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Warszawski

Promotor pomocniczy rozprawy
dr Anna Barabasz
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 2015

Oświadczenie autora rozprawy:

oświadczam, że niniejsza rozprawa została napisana przeze mnie samodzielnie.

data

podpis autora rozprawy

Oświadczenie promotora rozprawy:

niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

data

podpis promotora rozprawy

Oświadczenie promotora pomocniczego rozprawy:

niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

data

*podpis promotora
pomocniczego rozprawy*

Do or do not, there is no try.
Yoda

Pracę dedykuję mojej żonie Zofii,
synom Witkowi i Jasiowi oraz psu Hecy.
Dziękuję Wam za cierpliwość i całą resztę!

Dziękuję za naukowe przewodnictwo i nieocenioną pomoc
Pani Profesor Danucie Marii Antosiewicz.

Dziękuję wszystkim pracownikom i studentom
Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin za twórczą i przyjacielską atmosferę.

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE

% (w/v)	stężenie procentowe wagowo/objętościowe
% (v/v)	stężenie procentowe objętościowo/objętościowe
35S CaMV	promotor wirusa mozaikowatości kalafiora
aac.	<i>ang. amino acid</i> - aminokwasy
ASA	atomowa spektrometria absorpcyjna
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATPaza	adenozynotrifosfataza
AtHMA4-C	<i>ang. Heavy Metal ATPase 4 C-terminal</i> – konstrukt zawierający tylko koniec C białka HMA4 bez domen transbłonowych z <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtHMA4-F (AtHMA4)	<i>ang. Heavy Metal ATPase 4 Full-length</i> – białko HMA z <i>A. thaliana</i>
AtHMA4-T	<i>ang. Heavy Metal ATPase 4 Truncated</i> – białko HMA bez końca C z <i>A. thaliana</i>
BSA	albumina z surowicy bydłowej
Cys	cysteina
CAX	<u>C</u> Ation e <u>X</u> changer
cz. d. a.	czysty, do analiz (odczynniki)
DAB	3,3'-diaminobenzzydina
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNaza	deoksyrybonukleaza
dNTP	deoksyrybonukleotyd
EDTA	wersenian dwusodowy (sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego)
GFP	białko zielonej fluorescencji <i>ang. Green Fluorescent Protein</i>
GSH	glutation
HEPES	kwas 4-(2-hydroksytylo)piperazyno-1-metanosulfonowy
HMA2	<i>ang. Heavy Metal ATPase 2</i>
ICP-MS	spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej
MES	kwas 2-morfolino-etanosulfonowy
MS	pożywka Murashige i Skoog'a

NtHCT	transferaza hydroksycynamoylu z <i>Nicotiana tabacum</i>
NtHMA3	ang. <u>H</u> heavy <u>M</u> etal <u>A</u> TPase 3 z <i>N. tabacum</i>
NtIRT1	ang. <u>I</u> ron-regulated <u>T</u> ransporter <u>1</u> z <i>N. tabacum</i>
NtMTP1a	<u>M</u> etal <u>T</u> olerance <u>P</u> rotein 1 z <i>N. tabacum</i>
NtNAS1	syntaza nikotianaminy 1 z <i>N. tabacum</i>
NtOMT I	białko zbliżone do O-methyltransferase-like 2 z <i>A. thaliana</i>
NtPrx11a	peroksydaza zlokalizowana w ścianie komórkowej z <i>N. tabacum</i>
NtVCaB42	aneksyna z <i>N. tabacum</i>
NADPH	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NA	nikotianamina
PC-Cd	kompleksy fitochelatyn z kadmem
PCS	syntaza fitochelatyn
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy – ang. <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PHIME	<u>P</u> ublic <u>H</u> ealth <u>I</u> mpact of long-term, low level <u>M</u> ixed <u>E</u> lement exposure in susceptible population strata (skrót tytułu projektu)
P _i	fosforan nieorganiczny
pz	par zasad
ROS	– reaktywne formy tlenu ang. <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
RT	reakcja odwrotnej transkrypcji ang. <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją ang. <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa <u>S</u> uper <u>O</u> xid <u>D</u> ismutase
TRIS	<u>T</u> R <u>I</u> hydrok <u>S</u> ymetyloaminometan
ZIP	ang. <u>Z</u> inc-regulated transporter/ <u>I</u> ron regulated transporter-like <u>P</u> rotein

STRESZCZENIE

AtHMA4 z *A. thaliana* koduje białko z rodziny P_{1B}-ATPaz. Białko to zlokalizowane w plazmolemie odpowiedzialne jest za usuwanie jonów Zn i Cd z cytoplazmy do apoplastu. *AtHMA4* jest obecne w korzeniach w miękiszu ksylemowym, gdzie poprzez załadunek naczyni ksylemu, bierze udział w kontroli translokacji obu metali z korzenia do pędu.

Celem badań niniejszej pracy doktorskiej była ocena przydatności genu *AtHMA4* i jego wariantów (*AtHMA4-T* - bez końca C oraz *AtHMA4-C* - koniec C bez domen transbłonowych) dla modyfikacji genetycznych roślin w celu zmiany dystrybucji Zn i Cd pomiędzy korzeniem i pędem dla potrzeb fitoremediacji i/lub biofortyfikacji. Ocenę oparto o porównawczą analizę tytoniu (*Nicotiana tabacum*) typu dzikiego i po transformacji badanymi genami (ekspresjonowanymi pod konstytutywnym promotorem CaMV 35S), pod względem pobierania i akumulacji Zn i Cd, dystrybucji komórkowej i tkankowej tych metali, a także zmiany wzoru ekspresji genów endogennych w transformowanym tytoniu.

W pierwszym etapie badań wykazano, iż w wyniku ekspresji *AtHMA4* w tytoniu zachodzi zmiana nie tylko dystrybucji Zn i Cd korzeń/pęd, ale także pobierania obu metali (od hamowania do stymulacji), przy czym rodzaj modyfikacji był zależny od ich stężenia w pożywce. Jest to zaskakujące gdyż *AtHMA4-F* nie bierze udziału w pobieraniu metali. Wyniki wskazywały, iż wprowadzenie białka *AtHMA4* do tytoniu prowadzi do zaburzenia homeostazy metali, co skutkuje indukcją procesów regulacji endogennych mechanizmów odpowiadających za pobieranie Zn i Cd. Wysunięto hipotezę, iż jednym z możliwych powodów zaburzenia homeostazy metali w tytoniu z ektopową ekspresją *AtHMA4-F* jest wynikająca z aktywności kodowanego przez transgen białka (eksporter Zn/Cd) zmiana dystrybucji Zn/Cd pomiędzy symplastem a apoplastem w komórkach wszystkich tkanek badanych roślin. Okazało się, iż rzeczywiście u transformantów stężenie Zn/Cd w apoplaście jest wyższe zaś w symplacie niższe w stosunku do typu dzikiego, zmieniona jest także lokalizacja Zn na poziomie tkankowym. W dalszych badaniach wykazano, iż obserwowane zmiany w dystrybucji/lokalizacji Zn na poziomie komórkowym/tkankowym przyczyniają się do powstania na liściach transformantów objawów toksyczności Zn – nekroz, co wskazuje na obniżenie poziomu tolerancji na ten metal w wyniku ekspresji *AtHMA4*. Otrzymane wyniki skłaniają jednak do zmiany paradygmatu myślenia o nekrozach, wskazując, że za ich powstawaniem kryje się specyficzny mechanizm tolerancji, który polega na ochronie blaszki liściowej jako całości przed nadmiarem Zn poprzez załadunek dużych ilości metalu jedynie do grup komórek, które zamierając tworzą nekrozy. Podwyższony poziom Zn w apoplaście wydaje się być związany z inicjacją tego procesu.

Celem kolejnego etapu prac była identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za obniżenie akumulacji Cd w tytoniu w wyniku ekspresji *AtHMA4*. W oparciu o analizę z użyciem mikromacierzy DNA ustalono, iż ekspresja transgeny ingeruje w metabolizm roślin transformowanych zmieniając wzór ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację homeostazy metali (*NtIRT1*, *NtNAS1*, *HMA3*, *MTP1a*), brak jednak obniżenia poziomu transkrypty potencjalnych transporterów Cd. Ustalono, iż za obniżenie pobierania/akumulacji Cd w tytoniu z ekspresją *AtHMA4* odpowiada wzrost lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną korzenia (wzrost ekspresji genów ze szlaku biosyntezy lignin, badania histologiczne).

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej pokazały, iż wprowadzenie genu do rośliny jest pierwszym etapem generowania zmian w transformancie, prowadzącym do modyfikacji endogennych procesów molekularnych, a w efekcie metabolicznych – co skutkuje otrzymaniem rośliny o zmienionym fenotypie. Badania wskazują zatem na kluczowy udział modyfikacji endogennych procesów molekularnych i fizjologicznych w transformowanej roślinie w generowaniu fenotypu transformanta.

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej pokazały, że ekspresja *AtHMA4-F* i jego wariantów jedynie w niewielkim stopniu może być użyteczna dla celów biotechnologii, stanowią one jednak ważną wskazówkę przy planowaniu przyszłych transformacji genami kodującymi białka, nie tylko o podobnej do *AtHMA4* funkcji, ale także innymi transporterami metali.

SUMMARY

Arabidopsis thaliana HMA4 protein (belonging to P_{1B}-ATPases) exports Zn²⁺ and Cd²⁺ out of the cytoplasm to the apoplast. The *AtHMA4* is expressed in the vascular tissue of roots, stems and leaves suggesting the role in Zn xylem loading, and therefore in Zn nutrition in plants.

In this PhD project the *AtHMA4* and its mutants (*AtHMA4-T* - without C-terminous and *AtHMA4-C* – just the C-terminous without transmembrane domains) were ectopically expressed in the model plant *Nicotiana tabacum* under the CaMV 35S promoter. The assumption was that *AtHMA4* as a gene involved in the control of Zn/Cd xylem loading, seemed to be a suitable candidate for engineering modifications of metal root/shoot partitioning for biotechnological applications. The aim was also to show the mechanisms that lead to the generation of metal-related phenotypes of transgenic tobacco plants.

The first results already showed that *AtHMA4* expressing plants did not display expected increase in Zn and/or Cd root-to-shoot translocation; instead inhibition of Zn and Cd uptake was noted (although *AtHMA4* is not an uptake protein). These were accompanied by increased Zn/Cd apoplastic concentration (due to *AtHMA4* export activity), and had an impact on subcellular metal status and on metal tissue distribution.

Secondly, it was shown that *AtHMA4* expression in tobacco leads to decreased tolerance to Zn (manifested by formation of necrosis). Further analysis showed that while there is the same Zn concentration in leaves of transgenic and wild type plants, the expression of *AtHMA4* leads to increased Zn accumulation in only certain mesophyll cells and to overloading of the apoplast with Zn. Our data suggest that when concentration of Zn in the apoplast is beyond of a certain threshold, a signal of Zn excess/toxicity is generated which induces a reorientation of Zn distribution leading to loading of Zn excess to groups of cells only, and by doing this protects other cells within this tissue from high Zn. Accumulation of Zn in such specific groups of cells may ultimately result in their death when Zn level is too high and become toxic – they turn into necrosis.

Thirdly it was considered worth to unravel the mechanism that is behind decreased uptake of Cd in transgenic plants which results in lower accumulation of this extremely toxic metal in upper parts of tobacco plants. Using microarray-based transcriptomics analyses of young roots it was established that expression of genes involved in cell wall lignification (*NtHCT*, *NtOMT 1* oraz *NtPRX 11a*) was increased in transgenic plants. Further results demonstrated that in *AtHMA4*-expressing tobacco, lignification was induced in external cell layers of roots. Results indicate that overloading of the apoplast with Cd (due to *AtHMA4* expression) leads to the development of the physical apoplastic barrier within the external cell layer, which likely resulted in the reduction of Cd uptake/accumulation.

The results of my PhD thesis showed that *AtHMA4* expression has very low potential to be widely used for biotechnology to enhance Zn/Cd translocation to shoots. The great value of my work is to show that introducing a gene is just the first step which acts as a switch for molecular and metabolic processes within a host plant and indirectly it contributes to the generation of the transgenic plant phenotype. The results of this thesis also fill the gap in our understanding how the transformation modify the host plant metal homeostasis what might be used for planning of future transformations and to avoid undesired effects.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE	4
STRESZCZENIE/SUMMARY	7
1. WSTĘP	12
1.1. Gospodarka rolna a mikroelementy i metale toksyczne	12
1.2. Cynk i kadm w komórce roślinnej	15
1.3. Przykłady modyfikacji genetycznej roślin w celu zmiany akumulacji Zn i Cd	20
1.4. Charakterystyka AtHMA4	21
1.4.1. P _{1B} -ATPazy	21
1.4.2. HMA4	23
1.4.3. AtHMA4	25
2. CEL PRACY I ZAŁOŻENIA	28
3. MATERIAŁY I METODY	31
3.1. Materiały	31
3.1.1. Materiał roślinny	31
3.1.2. Szczepy bakteryjne	32
3.1.3. Plazmidy i stosowane konstrukty	32
3.1.4. Pożywki do hodowli bakterii	32
3.1.5. Pożywki do hodowli roślin	34
3.1.6. Odczynniki	35
3.2. Metody	35
3.2.1. Sterylizacja nasion	35
3.2.2. Hodowla roślin na szalkach Petri'ego	35
3.2.3. Hodowla hydroponiczna	36
3.2.4. Badania poziomu ekspresji transgenów (<i>AtHMA4</i> , <i>AtHMA4-C</i> , <i>AtHMA4-T</i>) w tytoniu	36
3.2.5. Określenie lokalizacji białek fuzyjnych AtHMA4-F-GFP oraz AtHMA4-C-GFP w komórkach tytoniu	39
3.2.6. Analiza poziomu akumulacji i tolerancji na cynk i kadm roślin z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> , <i>AtHMA4-C</i> i <i>AtHMA4-T</i> – testy w kulturach hydroponicznych	42
3.2.7. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym, komórkowym (apoplast/sympast) oraz w organach roślin z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> i <i>AtHMA4-C</i>	44

3.2.8. Analiza zmiany ekspresji genów w tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> poddanemu ekspozycji na nietoksyczne stężenie Cd	53
3.2.9. Analiza poziomu lignifikacji, akumulacji H ₂ O ₂ oraz aktywności peroksydaz w tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> poddanemu ekspozycji na Cd	58
4. WYNIKI	62
4.1. Analiza poziomu ekspresji transgenów (<i>AtHMA4-F</i>, <i>AtHMA4-C</i>, <i>AtHMA4-T</i>) w tytoniu	62
4.2. Określenie lokalizacji <i>AtHMA4-F-GFP</i> oraz <i>AtHMA4-C-GFP</i> w komórkach tytoniu	62
4.3. Analiza poziomu akumulacji i tolerancji na cynk i kadm tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i>, <i>AtHMA4-C</i> i <i>AtHMA4-T</i> – testy hydroponiczne	64
4.3.1. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd	64
4.3.2. Poziom tolerancji na Zn i Cd u tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> , <i>AtHMA4-T</i> , <i>AtHMA4-C</i>	81
4.3.3. Podsumowanie	85
4.4. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym, komórkowym (apoplast/sympast) oraz w organach u tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> i <i>AtHMA4-C</i>.	86
4.4.1. Lokalizacja Zn i Cd na poziomie subkomórkowym – mikroanaliza rentgenowska EDX (Energy Dispersive X-ray microanalysis)	87
4.4.2. Analiza stężenia Zn w symplacie i apoplaście tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> i typu dzikiego	89
4.4.3. Analiza lokalizacji Zn w korzeniach i liściach roślin z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> oraz na poziomie komórkowym z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1	94
4.4.4. Analiza lokalizacji Zn w liściach roślin z ekspresją <i>AtHMA4-C</i>	101
4.5. Analiza zmian w ekspresji genów oraz procesach metabolicznych w tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> poddanemu ekspozycji na 0,25 µM stężenie Cd	103
4.5.1. Określenie stężenia Zn i Cd w apoplaście i symplacie tytoniu typu dzikiego oraz z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> poddanych ekspozycji na 0,25 µM Cd	104
4.5.2. Analiza poziomu ekspresji genów endogennych w korzeniach tytoniu hodowanych w obecności 0,25 µM Cd – badania z wykorzystaniem mikromacierzy tytoniowych.	106
4.5.3. Analiza kategorii funkcjonalnych według Gene Ontology (GO)	107
4.5.4. Podsumowanie badań z wykorzystaniem mikromacierzy i przedstawienie najważniejszych wyników	113
4.6. Weryfikacja poziomu ekspresji genów (wybranych na podstawie analizy mikromacierzowej), które mogłyby odpowiadać za ograniczenie pobierania Cd przez tytoń z ekspresją <i>AtHMA4-F</i>	115
4.7. Analiza poziomu transkryptu genów dodatkowych (kodujących białka mogące uczestniczyć w transporcie Cd lub regulacji homeostazy metali) w tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> i typu dzikiego	118

4.8. Analiza cytologiczna i biochemiczna	121
4.8.1. Analiza poziomu lignifikacji ścian komórkowych	122
4.8.2. Analiza poziomu H ₂ O ₂	125
4.8.3. Analiza aktywności peroksydaz: wszystkich i jonowo związanych ze ścianą komórkową	127
4.9. Analiza akumulacji pierwiastków w tytoniu z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> poddanego ekspozycji na Cd – profil jonowy	129
5. DYSKUSJA	133
5.1. Ekspresja <i>AtHMA4-F</i> w tytoniu prowadzi do zmiany poziomu pobierania i translokacji Zn z korzenia do pędu jedynie w wąskim zakresie stężeń w pożywce	134
5.2. Ekspresja <i>AtHMA4-F</i> w tytoniu prowadzi do zmiany poziomu tolerancji na Zn i Cd	135
5.3. Przeładowanie apoplastu cynkiem u roślin z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> prowadzi do zaburzenia homeostazy tego pierwiastka w korzeniach i pędach	137
5.4. Ekspresja <i>AtHMA4-F</i> w tytoniu zmienia poziom ekspresji genów endogennych odpowiedzialnych za homeostazę metali (Zn, Fe, Ca)	143
5.5. Ograniczenie pobierania Zn i Cd u roślin z ekspresją <i>AtHMA4-F</i> jest następstwem modyfikacji ściany komórek kory korzenia	148
5.6. Koniec C jest istotny dla aktywności białka AtHMA4 w układzie heterologicznym	152
5.7. Ekspresja <i>AtHMA-C</i> w roślinach tytoniu prowadzi do wzrostu pobierania Zn i Cd	153
5.8. Ekspresja <i>AtHMA4-C</i> w tytoniu prowadzi do obniżenia poziomu tolerancji na Zn lub Cd	155
6. PODSUMOWANIE	157
SPIS LITERATURY	161
SPIS PUBLIKACJI	172

1. Wstęp

1.1. Gospodarka rolna a mikroelementy i metale toksyczne

Zielona rewolucja w drugiej połowie ubiegłego wieku doprowadziła do ogromnego przełomu w rolnictwie, którego skutkiem było znaczące zwiększenie produkcji żywności na świecie, a przede wszystkim zwiększenie plonów roślin uprawnych takich jak kukurydza, ryż oraz pszenica (Fig. 1). Oprócz pozytywnych skutków wspomnianej rewolucji, związanych z perspektywą zaspokojenia potrzeb żywieniowych ludzi, ujawniły się także skutki negatywne, spośród których dwa poniższe mają duże znaczenie jako kontekst niniejszej pracy doktorskiej:

1. Wprowadzenie nowych odmian zbóż o wysokim plonie ziarna, ale mających w nasionach obniżone ilości biodostępnych mikroelementów takich jak żelazo (Fe) lub cynk (Zn). Obniżenie to wynika ze wzrostu masy ziarna, któremu nie towarzyszy wzrost pobierania i akumulacji pierwiastków (Graham i inni, 2007).
2. Intensyfikacja rolnictwa poprzez używanie znacznych ilości nawozów spowodowała wzrost zanieczyszczenia gleb uprawnych metalami balastowymi takimi jak kadm (Cd). Zielonej rewolucji towarzyszył także wzrost populacji ludzkiej oraz w odpowiedzi na zwiększające się potrzeby ludności, także rozwój przemysłu. W efekcie, w środowisku człowieka zwiększeniu uległ poziom stężenia biodostępnego kadmu. Zboża uprawiane były na coraz bardziej zanieczyszczonej Cd ziemi, a ponieważ są one głównym produktem spożywczym na świecie, następowało gromadzenie się coraz większych ilości tego toksycznego metalu w organizmach ludzi.

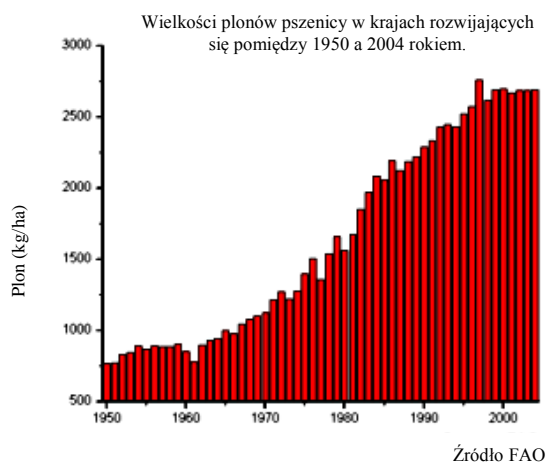


Fig. 1 Plony pszenicy w krajach rozwijających się w latach 1950 - 2004.
Źródło FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

W wyniku zielonej rewolucji duża część populacji ludzkiej została postawiona wobec nowego problemu związanego z „subtelną formą głodu – głodu jakości” (cytat Sir Alberta Howarda z 1947).

Niniejsza praca doktorska porusza trzy aspekty opisanej problematyki:



1. *Z jednej strony jakość żywności zależy od ilości mikroelementów ważnych dla człowieka.*

Właściwa dieta człowieka wymaga obecności co najmniej 22 mikroelementów (Welch i Graham, 2004; White i Broadley, 2005; Graham i inni, 2007). Szacuje się, że ok. 60% ludności na świecie jest narażona na deficyt żelaza, natomiast ok. 31% na deficyt cynku (wg WHO - **W**orld **H**ealth **O**rganization). Deficyt niektórych mikroelementów w diecie człowieka wynika przede wszystkim z ich obniżonej ilości w żywności pochodzącej z produkcji rolnej w regionach o niedoborach niezbędnych pierwiastków w glebie lub ich niskiej biodostępności. Przyczyną jest także stosowanie odmian roślin, które akumulują w częściach jadalnych ilości mikroelementów niewystarczające dla potrzeb człowieka (Welch i Graham, 2002; Graham i inni, 2007). Niedożywienie wynikające z deficytu składników mineralnych jest aktualnie jednym z poważniejszych wyzwań globalnych dla ludzkości (Copenhagen Consensus, 2004: <http://www.copenhagenconsensus.com>).

Są różne podejścia metodyczne mające na celu rozwiązanie problemu niedoboru mikroelementów niezbędnych w diecie ludzi. Jednym z nich jest wprowadzenie zróżnicowanej diety, innym suplementacja pożywienia w mikroelementy. Bardzo ciekawe i kompleksowe rozwiązanie to biofortyfikacja, czyli zwiększenie ilości pierwiastków odżywczych w jadalnych częściach roślin w wyniku różnorodnych zabiegów (np. konwencjonalnych, biotechnologicznych). Możliwość zwiększenia ilości mikroelementów w diecie poprzez biofortyfikację stanowi ważny cel badań w wielu ośrodkach naukowych na świecie. Podstawowym problemem, który musi zostać rozwiązany jest niepełna znajomość kluczowych szlaków metabolicznych decydujących o stężeniu pierwiastków w różnych częściach roślin oraz sposobów regulacji procesów decydujących o dystrybucji mikroelementów w roślinach.



2. *Z drugiej strony obecność toksycznych metali ciężkich takich jak Cd, stanowi zagrożenie dla zdrowia człowieka.*

Niektóre metale ciężkie stanowią ogromne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Cd jest na siódmym miejscu wśród dwudziestu najbardziej niebezpiecznych toksyn. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (**IARC** z ang. **I**nternational **A**gency for **R**esearch on **C**ancer) - agenda WHO, w 1993 roku wpisała Cd na listę substancji rakotwórczych, wskazując na podstawie dostępnej literatury, że głównym źródłem tego pierwiastka dla ludzi są produkty pochodzenia roślinnego. Według Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 września

2002 r. (w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi dla grupy B gruntów zaliczanych do użytków rolnych) dopuszczalne stężenie Cd na głębokości od 0 do 0,3 m poniżej powierzchni terenu wynosi 4 mg/kg suchej masy.

Obecność Cd w glebie jest zagrożeniem także dla roślin. Stężenie kadmu w roztworze glebowym gleb o średnim poziomie skażenia oceniono na 0,32 μM Cd. Przy stężeniu powyżej 35 μM Cd (występującym w glebach silnie zanieczyszczonych) przetrwają tylko rośliny hipertolerancyjne mające zdolność do hiperakumulacji tego pierwiastka (Sanita di Toppi i Gabrielli, 1999).

Kadm jest łatwo pobierany i transportowany do wszystkich organów roślin, łącznie z częściami jadalnymi, wchodząc tym samym do łańcucha pokarmowego człowieka. Należy podkreślić, że kadm jest pierwiastkiem podlegającym stałej akumulacji w organizmach zwierzęcych i ludzkich (Kabata-Pendias i Pendias, 1999). Z tego względu w wielu wiodących ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad poszukiwaniem mechanizmów molekularnych i biochemicznych odpowiedzialnych w roślinie za ograniczenie akumulacji Cd, szczególnie w ich częściach jadalnych.



3. *Z trzeciej strony możliwość akumulacji w częściach nadziemnych dużych ilości metali toksycznych, także Cd, może być użyteczna w oczyszczaniu gleb przy pomocy roślin.*

Zdolność do akumulacji wysokich stężeń Cd w tkankach pędów może być wykorzystana przez człowieka do usuwania Cd z gleby przy użyciu roślin – w procesie fitoremediacji (Cunningham i inni, 1995; Chaney i inni, 1997). Technologia ta jest zdecydowanie bardziej ekonomiczna i przyjazna dla środowiska (między innymi nie prowadzi do zniszczenia życia biologicznego w glebie) niż dotychczas stosowane tradycyjne metody remediacji takie jak: a) *ex-situ* - przymywanie, usunięcie gleby, lub b) *in-situ* - ekstrakcja, przepłukiwanie i wiązanie zanieczyszczeń środkami chemicznymi w glebie.

Realizacja celów wymienionych w trzech powyżej opisanych aspektach wymaga opracowania metod pozwalających na modyfikację poziomu akumulacji i dystrybucji pierwiastków w tkankach. Najważniejszymi procesami, które decydują o ilości akumulowanych metali w roślinach są: 1) pobieranie, 2) tolerancja podwyższonych stężeń oraz 3) dystrybucja metali, ze szczególnym uwzględnieniem kontroli transportu metali pomiędzy korzeniem a pędem. Bardzo istotna jest znajomość mechanizmów dystrybucji pierwiastków w roślinie, gdyż odpowiednia modyfikacja tego procesu może umożliwić ograniczenie lub zwiększenie stężenia metali w częściach jadalnych. I tak znajomość mechanizmów regulacji translokacji metali z korzenia do pędu jest ważna dla biofortyfikacji jadalnych części nadziemnych. Także dla potrzeb fitoremediacji

(fitoekstrakcji) kluczową cechą roślin jest akumulacja dużych ilości toksycznych metali w pędzie, dzięki czemu technicznie najłatwiej można usunąć je ze środowiska.

Na obecnym etapie rozwoju agrotechnicznego, metody tradycyjnego rolnictwa nie są wystarczające do jednoczesnego zwiększenia plonu oraz jego jakości pod względem ilości mikroelementów (dla celów biofortyfikacji). Problemem z użytecznością roślin do fitoremediacji jest także zwiększenie akumulacji metali balastowych w pędach o dużej biomase. Intensywny rozwój metod inżynierii genetycznej stworzył nowe możliwości modyfikowania ścieżek metabolicznych w roślinach. Wydaje się, że dla celów biofortyfikacji najbardziej obiecująca pod względem efektywności jest transformacja roślin genami warunkującymi zwiększoną akumulację mikroelementów i ograniczoną akumulację pierwiastków toksycznych w jadalnych częściach nadziemnych. Natomiast dla celów fitoremediacji celowe jest zwiększenie akumulacji pierwiastków balastowych w częściach nadziemnych. Fenotyp roślin transformowanych nie zawsze jest jednak zgodny z oczekiwanym. Jak wskazują ostatnie badania, przyczyną są m.in. indukowane ekspresją transgenu zmiany w transkrypcie i metabolomie rośliny użytej do transformacji (Antosiewicz i inni, 2014). Zatem ważną częścią badań w celu otrzymania transformantów o oczekiwanym fenotypie jest położenie większego nacisku na prace, prowadzące do poznania procesów zmienionych w roślinie-gospodarzu w wyniku transformacji.

1.2. Cynk i kadm w komórce roślinnej

W środowisku występuje wiele pierwiastków, których właściwości fizyko-chemiczne są niezbędne dla istnienia życia (Lewak i Kopcewicz, 2009). Do kluczowych pierwiastków dla rozwoju roślin zalicza się: N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, B, Cu, Mo, Mn, Cl. Najważniejsze funkcje fizjologiczne, które te pierwiastki pokarmowe pełnią w roślinie to tworzenie wiązań wysokoenergetycznych (P), aktywacja enzymów (Mg, Mn, K, Zn), udział w procesach oksydo-redukcyjnych (Fe, Cu). Bardzo ważna jest także zdolność komórek do utrzymywania równowagi pomiędzy kationami jedno- (K^+) i dwuwartościowymi (Ca^{2+}), dzięki której następuje kontrola regulacji poziomu uwodnienia koloidów komórkowych oraz stabilizacji odczynu komórki poprzez tworzenie odpowiednich układów buforowych. Pierwiastki mineralne mają także istotny wpływ na potencjał chemiczny wody. Niedobór jak i nadmiar pierwiastków może być dla roślin szkodliwy i prowadzić do zahamowania wzrostu, chloroz, nekroz, a także zaburzeń rozwojowych i rozrodczych.

Oprócz pierwiastków niezbędnych, w glebie występuje też szereg pierwiastków, które nie pełnią żadnej znanej roli w metabolizmie komórki roślinnej (takie jak: Tl, Pb, As, Cd, Hg i inne) i stanowią dla niego zagrożenie. Toksyczność dla komórki roślinnej ze strony pierwiastków takich jak As, Cd lub Hg wynika głównie z ich dużej mobilności w roślinie i zdolności do włączania się

w struktury białkowe, prowadzącej do zaburzenia ich funkcji lub dezaktywacji. Jednym z takich procesów, który jest wspólny dla As, Cd i Hg jest łatwe wiązanie się z grupami tiolowymi białek, co prowadzi do zniszczenia ich struktury trzeciorzędowej.

Wśród powyżej opisanych pierwiastków występują pierwiastki przejściowe bloku d układu okresowego takie jak: V, Cd, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo i inne. Ich główne cechy fizykochemiczne wynikają z niekompletnie zapełnionej podpowłoki elektronowej d, przy czym dla Zn, Hg i Cd tylko w niektórych stanach oksydacyjnych (np. +1, niewystępujących w roślinach). Ze względu na swoje właściwości (w tym występowanie form o różnym stopniu utlenienia), metale przejściowe są niezbędne w metabolizmie roślin oraz innych organizmów między innymi w kontroli aktywności oksydo-redukcyjnej w warunkach fizjologicznych (Cu, Fe, Mn, V) (Frausto da Silva i Williams, 2001; Clemens, 2006). Właściwości metali przejściowych, które sprawiają, że są one niezbędne dla organizmów żywych, są także powodem, dla którego ich nadmiar może być toksyczny. Jedną z takich cech jest aktywność oksydo-redukcyjna jonów metali, która może prowadzić do powstawania w reakcjach Fentona reaktywnych form tlenu (Halliwell i Gutteridge, 1990), stanowiących w komórkach roślinnych duże zagrożenie dla metabolizmu. Niekontrolowane wiązanie się metali z różnymi grupami funkcyjnymi białek, na przykład grupami tiolowymi, azotowymi lub tlenowymi może prowadzić do uszkodzenia ich struktury i upośledzenia funkcji, które pełnią. W związku z tym, poziom metali przejściowych w komórce jest kontrolowany w zakresie stężeń fizjologicznych, czyli takich, które nie wywołują efektów deficytu lub nadmiaru, będącego w obu przypadkach zagrożeniem dla metabolizmu komórkowego (Clemens, 2006).

Cynk (Zn)

Cynk jest pierwiastkiem przejściowym niezbędnym dla metabolizmu rośliny. Jest on kofaktorem dla ponad 300 enzymów oraz pełni rolę strukturalną w tworzeniu domen zwanych „palcami cynkowymi”, odpowiadających za wiązanie się czynników transkrypcyjnych z DNA. (Sinclair i Krämer, 2012). Deficyt Zn może prowadzić do zmniejszenia intensywności fotosyntezy, procesu tworzenia sacharozy oraz skrobi, metabolizmu białkowego, zaburzenia integralności błon. Ograniczony dostęp Zn hamuje także syntezę kwasu 3-indoliloctowego (auksyna) i zmienia gospodarkę hormonalną roślin. Z kolei nadmiar Zn prowadzi do zmniejszenia masy korzenia i pędu, zawijania się liści oraz powstawania chloroz i nekroz (Alloway, 2008). Toksyczność nadmiaru Zn wynika przede wszystkim z jego wysokiego powinowactwa do grup tiolowych, co może prowadzić do zniszczenia trzeciorzędowych struktur białkowych. Obecność nadmiaru Zn skutkuje obniżeniem jego transportu do części nadziemnych oraz także prowadzi do zmniejszenia translokacji do pędu Fe, Mg, K, P i Ca, co wpływa na procesy metaboliczne w częściach nadziemnych (Rout i Das, 2003). Wiadomo, że białka odpowiadające za transport błonowy pierwiastków mają różną

specyficzność wobec substratu. I tak na przykład białka odpowiedzialne za transport Fe mogą przenosić przez błony także inne kationy, w tym Zn. Gdy roślina jest narażona na nadmierne (toksyczne) ilości Zn, następuje inicjacja procesów mających na celu ograniczenie jego pobierania, w tym także poprzez obniżenie ekspresji genów kodujących nie tylko transportery, dla których Zn jest głównym substratem, ale także transportery Fe, dla których Zn może być substratem. Mechanizmy, które odpowiadają za regulację procesów metabolicznych dotyczących jednych pierwiastków przy udziale białek, których główną rolą jest utrzymanie homeostazy innych podobnych chemicznie pierwiastków, nazwano cross-homeostazą (z j. ang.).

Zn pobierany jest z gleby przede wszystkim w formie jonowej Zn^{2+} . Jony Zn^{2+} dostają się do korzenia na drodze biernego wnikania wody z jonami do apoplastu gdzie następnie dochodzi do:

- a) absorpcji Zn w strukturach ściany komórkowej, co wynika z obecności w nich zdysocjowanych grup karboksylowych (Krzesłowska, 2011);
- b) transportu Zn do komórki przy udziale białek na drodze (White, 2012):
 - pierwotnego transportu aktywnego poprzez pompy jonowe zależne od hydrolizy nośników energii, takich jak ATP lub difosforany (PP_i);
 - wtórnego transportu aktywnego poprzez białka transportujące Zn w połączeniu z przenoszeniem kationów (np. H^+ , K^+ , Na^+) prowadzącym do wytworzenia gradientu elektrochemicznego. Wyróżnić można transport jonów w tym samym (symport) lub przeciwnym kierunku (antyport);
 - transport pasywny poprzez kanały jonowe zgodnie z gradientem elektrochemicznym.
- c) transportu Zn apoplastem wraz z wodą aż do endodermy stanowiącej barierę fizyczną dla przenoszenia tą drogą. Dalszy transport Zn możliwy jest drogą symplastyczną.

Pobieranie Zn^{2+} do komórki odbywa się przede wszystkim dzięki transporterom z rodziny ZIP – **Z**RT, **I**RT-like **P**rotein – ZRT **Z**inc **R**egulated **T**ransporter, IRT **I**ron **R**egulated **T**ransporter (Pence i inni, 2000; Colangelo i Guerinot, 2006; Broadley i inni, 2007; Palmgren i inni, 2008; White i Broadley, 2009; Shanmugam i inni, 2011). W *Arabidopsis thaliana* istnieje 15 białek z rodziny ZIP, które mogą odpowiadać za homeostazę Zn i Fe. Najlepiej poznanym jest AtIRT1, białko które jest odpowiedzialne za pobieranie Fe^{2+} w warunkach deficytu. Żelazo obecne w roztworze glebowym w formie utlenionej Fe^{3+} , jest redukowane do Fe^{2+} przez aktywną na powierzchni korzeni reduktazę żelazową FRO2 - **F**erric **R**eductase **O**xidase2. Ekspresja genów *AtIRT1* i *AtFRO2* jest regulowana zgodnie z zapotrzebowaniem rośliny na Fe zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka (Robinson i inni, 1999). AtIRT1 jest białkiem o niskiej specyficzności wobec substratu i może przenosić także jony Zn^{2+} , Mn^{2+} jak również Cd^{2+} (Sinclair i Kramer, 2012). Uważa się, że Zn może być pobierany także przez inne białka z rodziny ZIP, jednak ich rola

jest zbadana tylko częściowo. Pobieranie Zn związanego z fitozyderoforami u traw odbywa się poprzez transportery YSL - **Y**ellow **S**tripe **L**ike (von Wirén i inni, 1996; White i Broadley, 2009).

Ważną rolę w utrzymaniu homeostazy metali pełnią transportery zlokalizowane w tonoplaście, odpowiedzialne za ich akumulację w wakuoli lub kontrolowane uwalnianie do cytoplazmy. Należą tu między innymi białka MTP (**M**etal **T**olerance **P**rotein) z rodziny CDF (**C**ation **D**iffusion **F**acilitator). W *A. thaliana* *AtMTP1* oraz *AtMTP3* pełnią istotną rolę w detoksyfikacji Zn w komórce poprzez akumulację w wakuoli (Desbrosses-Fonrouge i inni, 2005; Arrivault i inni, 2006). Podobnie *AtHMA3* z rodziny HMA (**H**eavy **M**etal **A**ssociated) odpowiada za transport Zn do wakuoli (White i Broadley, 2009). W obrębie cytoplazmy Zn związany jest z ligandami o niskiej masie cząsteczkowej takimi jak glutation [GSH] lub nikotianamina [NA] (Broadley i inni, 2007; Trampczynska i inni, 2010). Wykazano, że niskocząsteczkowe ligandy wiążące się z Zn są transportowane do wakuoli przez białko *AtZIF1* (**Z**inc-**I**nduced **F**acilitator **I**). Rolą wszystkich białek odpowiedzialnych za akumulację Zn w wakuoli jest między innymi kontrola dostępności Zn dla transportu korzeń-pęd (Haydon i Cobbett, 2007). Kolejny ważny proces w utrzymaniu homeostazy to remobilizacja Zn z wakuoli i transport do cytoplazmy. Biorą w nim udział białka NRAMP (**N**atural **R**esistance-**A**ssociated **M**acrophage **P**rotein) regulowane między innymi deficytem Zn (Thomine i inni, 2003). Wykazano, że białko *AtNRAMP3*, które jest transporterem jonów Fe^{2+} w warunkach deficytu Fe, może także odpowiadać za eksport Zn i Mn z wakuoli (Thomine i inni, 2003; Clemens, 2006). Za transport Zn do cytoplazmy mogą też odpowiadać białka z rodziny ZIP. Na przykład uważa się, że białko tonoplastowe *AtZIP1* z *A. thaliana*, ekspresowane w walcu osiowym bierze udział w remobilizacji Zn z wakuoli, kontrolując w ten sposób ilość Zn przenoszonego do pędu (Milner i inni, 2013). Akumulacja Zn w wakuoli to jedna ze strategii ochrony rośliny przed deficytem i nadmiarem tego pierwiastka w komórce oraz regulacji dystrybucji Zn pomiędzy korzeniem a pędem.

Transport Zn do pędu odbywa się wraz z wodą i innymi składnikami mineralnymi w naczyniach ksylemu. Dojrzałe komórki naczyń ksylemu są martwe i mają silnie zdrewniałe ściany komórkowe. Załadowanie Zn do ksylemu odbywa się poprzez eksport pierwiastków z symplastu komórek miękiszu ksylemowego do apoplastu, który bezpośrednio łączy się z apoplastem naczyń ksylemu. Główną rolę w tym procesie odgrywają białka z rodzin P_{1B} -ATPaz: *HMA2* i *HMA4* (Williams i Mills, 2005). Wykazano, że podwójny mutant *A. thaliana hma2hma4* ma zahamowany wzrost i obniżone stężenie Zn w pędzie oraz podwyższone stężenie tego pierwiastka w korzeniu (Hussain i inni, 2004). Cynk może być transportowany w ksylemie w formie jonowej, związanej z cytrynianem lub histydyną (von Wirén i inni, 1999; White i inni, 2002; Broadley i inni, 2007; Palmgren i inni, 2008). Uważa się, że redystrybucja Zn w obrębie pędu oparta jest o transport floemem (Trampczynska i inni, 2010).

Kadm (Cd)

Kadm jest pierwiastkiem, który nie pełni żadnej funkcji metabolicznej w komórkach roślinnych. Nie są także znane specyficzne transportery dla Cd. W związku z brakiem pełnej specyficzności białek transportujących pierwiastki pokarmowe takie jak Fe, Zn, Mn lub Ca mogą one odpowiadać także za transport Cd (Clemens, 2006).

Kadm dostający się do apoplastu, podobnie jak Zn, wiąże się z wolnymi resztami karboksylowymi pektyn ściany komórkowej. Transport kadmu przez błony komórkowe odbywa się dzięki przenośnikom dla wapnia (np. LCT1). Cd może być transportowany do komórki także przez białka z rodziny ZIP takie jak transportery jonów Fe^{2+} (IRT) i Zn^{2+} (ZIP). Poziom ekspresji transporterów z rodziny ZIP wzrasta w warunkach deficytu Fe lub Zn, co przyczynia się do bardziej intensywnego pobierania Cd (Clemens, 2006). Analogicznie jak Fe i Zn, Cd może także być pobierany w formie związanej z fitozyderoforami poprzez transportery YSL (DalCorso i inni, 2008). Cd dostaje się do komórek także poprzez transportery dla Mn^{2+} , takie jak AtNRAMP1 zlokalizowany w błonie komórkowej (Clemens, 2006; Cailliatte i inni, 2010), czy też indukowany deficytem Fe *OsNRAMP5* z ryżu (*Oryza sativa*) (Sasaki i inni, 2012).

Kadm, ze względu na powinowactwo do reszt tiolowych, jest wiązany w komórkach z glutationem (GSH) oraz z jego pochodnymi - fitochelatynami (PC). Kompleksy Cd z PC są przenoszone do wakuoli przez białka z rodziny ABCC (Park i inni, 2012). Kadm obecny w komórce w formie jonowej może być także transportowany do wakuoli przy udziale:

- a) antyporterów kation/ H^+ CAX (calcium exchangers). Korenkov i inni (2007) wykazali że AtCAX2 i AtCAX4 mogą odpowiadać za sekwestrację Zn i Cd w wakuoli;
- b) białek z rodziny CDF: MTP1;
- c) $\text{P}_{1\text{B}}$ ATPazy: HMA3.

Transport radialny Cd w korzeniu odbywa się przede wszystkim drogą apoplastyczną (Clemens, 2006; Gallego i inni, 2012). Endoderma, ze względu na obecność w komórkach pasemek Caspary'ego, stanowi barierę dla apoplastycznego transportu wody i jonów. W tym miejscu Cd dostaje się do komórek poprzez opisane wcześniej transportery dla pierwiastków pokarmowych. Z kolei w załadunku Cd do ksylemu biorą udział transportery cynku AtHMA2 i AtHMA4 (Mills i inni, 2005; Wong i Cobbett, 2008).

W oparciu o znajomość genów zaangażowanych w kontrolę pobierania i dystrybucji metali podejmuje się próby modyfikacji tych procesów w roślinie. W następnym rozdziale przedstawiono szereg podjętych prób transformacji dla celów biofortyfikacji i fitoremediacji.

1.3. Przykłady modyfikacji genetycznej roślin w celu zmiany akumulacji Zn i Cd

W rozdziale 1.1 opisano zagadnienia związane z jakością żywności pod względem zawartości niezbędnych mikroelementów, jak i obecności metali toksycznych. Jedną z dróg modyfikacji składu mineralnego roślin są metody inżynierii genetycznej. Poniżej przedstawiono wybrane publikacje, prezentujące próby zwiększenia akumulacji mikroelementów w częściach jadalnych roślin poprzez modyfikację mechanizmów (a) pobierania, (b) akumulacji (c) translokacji metali z korzenia do pędu.

a) Modyfikacja pobierania metali z podłoża

Cynk pobierany jest z gleby między innymi przy udziale transporterów z rodziny ZIP (szczegóły w rozdziale 1.2). Aby zwiększyć pobieranie tego metalu, Ramesh i inni (2004) wykonali transformację jęczmienia (*Hordeum vulgare*) genem *ZIP1* pochodzącym z *A. thaliana* pod konstytutywnym promotorem ubikwityny (Ubi-1). Gen *AtZIP1* jest scharakteryzowany jako ważny element systemu pobierania Zn w *A. thaliana* przy deficycie tego pierwiastka w podłożu (Grotz i inni, 1998). W wyniku transformacji pobieranie Zn i Fe wzrosło od 1,5 do 3 razy.

Innym przykładem próby modyfikacji pobierania Zn była nadekspresja *AtZIP3* pod konstytutywnym promotorem CaMV35S (**C**aliflourer **M**osiaic **V**irus) w roślinach *A. thaliana* (Lin i inni, 2009). Białko *AtZIP3* zlokalizowane w błonie plazmatycznej, transportuje Zn i Fe do komórki. Poziom ekspresji *AtZIP3* rośnie przy deficycie Zn, obniża się natomiast przy nadmiarze tego pierwiastka w podłożu. U roślin transgenicznych rosnących w optymalnych warunkach nastąpił wzrost (o ok. 25%) akumulacji Zn w pędzie, przy niezmienionym poziomie w korzeniach. Taki wynik wskazuje na wzrost pobierania Zn oraz jego translokacji do pędu. Co ciekawe, zanotowano 2-krotny wzrost akumulacji Fe w korzeniach roślin transformowanych, co wskazuje na wzrost pobierania również Fe bez zwiększenia jego translokacji do pędu (Lin i inni, 2009). Okazuje się więc, że ekotopowa nadekspresja zarówno *AtZIP1* w jęczmieniu oraz *AtZIP3* w rzodkiewniku może prowadzić do wzrostu pobierania Zn i Fe, jednak poziom ich akumulacji u transformanta zależy od składu mineralnego podłoża.

b) Modyfikacja akumulacji pierwiastków w wakuoli

AtMHX koduje antyporter jonów metali/protonów (H^+) odpowiedzialny za transport Zn ale także Fe i Mg do wakuoli (Shaul i inni, 1999; Berezin i inni, 2008). Spodziewano się więc, że jego nadekspresja pod CaMV35S w tytoniu zwiększy poziom transportu Zn do wakuoli, a za tym jego akumulacji, a także tolerancji. Okazało się jednak, że ekspresja *AtMHX* w tytoniu nie spowodowała wzrostu akumulacji Zn, natomiast nieoczekiwanie doprowadziła do obniżenia się biomasy oraz pojawienia się nekroz na górnych liściach, co wskazywało na wzrost wrażliwości roślin

transformowanych. Obniżenie poziomu tolerancji przypisano zwiększonemu eksportowi protonów do cytoplazmy (Berezin i inni, 2008).

Nadekspresja *AtMTP1* pod promotorem CaMV35S w *A. thaliana* spowodowała ok. 50% wzrost akumulacji Zn w korzeniach, a także wzrost poziomu tolerancji na nadmiar Zn, co jest następstwem sekwestracji Zn w wakuoli (van der Zaal i inni, 1999).

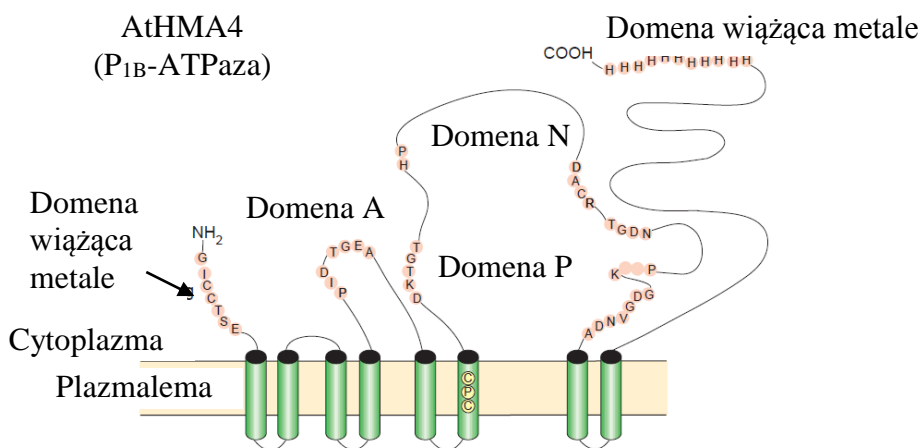
c) Modyfikacja translokacji pierwiastków z korzeni do pędu

Wiadomo, że załadunek Zn i Cd do ksylemu jest kontrolowany przez HMA2 i HMA4 (Mills i inni, 2003, 2005; Verret i inni, 2004; Hussain i inni, 2004). Wykorzystanie genów tych białek do transformacji roślin może prowadzić do zwiększenia translokacji obu metali do pędu i akumulacji w tym organie. W niniejszej pracy doktorskiej przedmiotem badań są rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) z ekspresją wariantów genu *AtHMA4* z *A. thaliana*, kodującego białko, które bierze udział w załadunku Zn i Cd do ksylemu.

1.4. Charakterystyka AtHMA4

1.4.1. P_{1B}-ATPazy

Gen *AtHMA4* z *Arabidopsis thaliana* koduje białko transportujące należące do P_{1B}-ATPaz. ATPazy typu P są dużą nadrodziną ATP-zależnych enzymów odpowiedzialnych za aktywny transport kationów poprzez błony biologiczne wbrew gradientowi elektrochemicznemu. Podział ATPaz typu P oparty jest o ich charakterystykę substratową, a nie pochodzenie (Mills i inni, 2003). W skład P_{1B}-ATPaz wchodzi białko HMA (Heavy Metal Associated), które odpowiadają za transport metali takich jak Cu, Zn, Co, Cd, Ag oraz Pb. Białka HMA dzielą się na dwie podgrupy: 1) transportery Zn/Co/Cd/Pb (w *A. thaliana* HMA1-4), 2) transportery Ag/Cu (w *A. thaliana* HMA5-8). P_{1B}-ATPazy występują w bakteriach, *archaea* oraz organizmach eukariotycznych. Uważa się, że powstały we wczesnych etapach ewolucji (Axelsen i Palmgren, 2001).



Budowa P_{1B}-ATPazy na przykładzie HMA4 pochodzącego z *A. thaliana*. Na podstawie rysunku Williams i Mills (2005).

Struktura P_{1B}-ATPaz

Konserwatywne regiony, które występują u wszystkich ATP-az typu P (Williams i Mills, 2005, Olesen i inni, 2007):

- obecność od 6 do 12 domen transbłonowych,
- motyw sekwencji aminokwasów DKTGT (Domena P - Phosphorylation) zawiera resztę asparaginową podlegającą fosforylacji podczas wiązania ATP,
- motyw GDGxNDxP zawiera miejsce wiązania z jonami magnezu,
- motyw PxxK wchodzi w interakcję z tlenem pochodzącym od reszty fosforanowej ATP domena A (Actuator) odpowiada za stan zamknięcia lub otwarcia pompy,
- domena N (Nucleotide binding) jest miejscem wiązania nukleotydów.

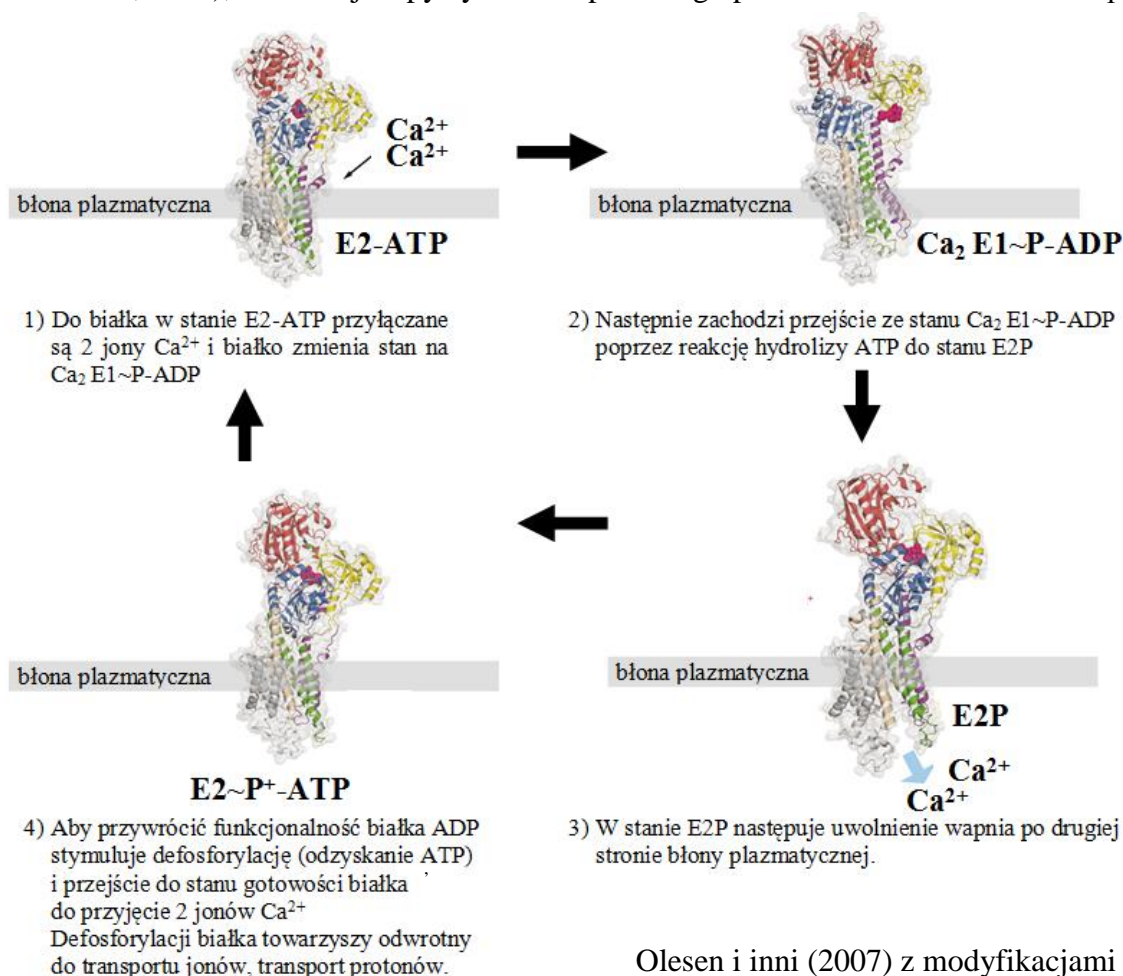
Motywy charakterystyczne jedynie dla P_{1B}-ATP-az (Mills i inni, 2005; Williams i Mills, 2005; Verret

i inni, 2005; Bækgaard i inni, 2010):

- obecność 8-miu domen transbłonowych;
- motyw CPx występuje w transbłonowej domenie 6 i wydaje się być to motyw kluczowy dla transportu jonów metali przejściowych. Wskazują na to wyniki badań, w których poprzez eliminację motywu w wyniku mutacji dochodzi do zahamowania funkcji transportowej;
- miejsce HP (HP locus) to najprawdopodobniej miejsce wiązania ATP lub domena odpowiedzialna za regulację powinowactwa miejsc wiązania dla nukleotydów;
- domeny wiążące metale zawierające pary cystein występują w różnych proporcjach przede wszystkim w obrębie C końca (najdłuższy koniec C z największą liczbą reszt cysteinowych). Na końcu C występuje także domena wiążąca metale zawierająca 11 kolejnych histydyn (występuje w AtHMA4 oraz NtHMAa). Domeny zawierające cysteiny jak i histydyny odpowiadają najprawdopodobniej za regulację aktywności procesu transportu metali poprzez dostarczanie metali do miejsca transportu lub aktywację białka. Co ciekawe, mutacje w domenach wiążących metale polegające na usunięciu wybranych par cystein w różnych częściach C końca lub usunięcie 11 histydyn powoduje zmniejszenie lub zwiększenie poziomu aktywności transportowej HMA (Verret i inni, 2005).

Mechanizm działania białek HMA

Transport prowadzony przez ATP-azy typu P (w tym HMA) zależy od dostępności ATP (Williams i Mills, 2005). W zależności od miejsca lokalizacji białka, substraty są przenoszone albo do apoplastu, albo do kompartmentów wewnątrzkomórkowych. Transport jonów metali przy udziale ATPaz typu P_{1B} jest podobny do działania wapniowej ATPazy typu P - SERCA1a (Olesen i inni, 2007), dla której etapy cyklu transportowego przedstawiono na schemacie poniżej:



1.4.2. HMA4

Badania filogenetyczne wskazują na istnienie w roślinach ortologów *AtHMA4* takich jak: *PtHMA4* z *Poplar trichocarpa*, *NcHMA4* z *Noccea caerulescens*, *HiHMA4* z *Hirschfeldia incana*, *EpHMA4* z *Eriocaulon parvulum*, *BpHMA4* z *Brasica rapa*, *AhHMA4* z *Arabidopsis halleri* i *AlHMA4* z *Arabidopsis lyrata* (Zorrig i inni, 2011). Wśród wymienionych gatunków są także hiperakumulatory metali zdolne do akumulacji w częściach nadziemnych bez objawów toksyczności powyżej 1000 mg Zn na kg suchej masy roślin oraz powyżej 100 mg Cd i Pb na kg suchej biomasy. Do roślin tych należą *Noccea caerulescens* (dawniej *Thlaspi caerulescens*,

hiperakumulator *Cd* i *Zn*), *Arabidopsis halleri* (*Zn* i *Cd*), *Hirschfeldia incana* (*Pb*). Okazuje się, że hiperakumulacja pierwiastków u tych roślin powiązana jest z obecnością zwiększonej liczby kopii genu *HMA4* oraz zwiększonym poziomem jego ekspresji. Ekspresja *NcHMA4* w drożdżach prowadziła do wzrostu tolerancji *Zn* i *Cd* na skutek zwiększonego transportu tych metali poza komórkę. Analiza Northern wykazała, że *NcHMA4* jest silnie ekspresjonowany w korzeniach roślin *N. caerulescens*. Ekspresja *NcHMA4* jest indukowana nadmiarem *Zn* i *Cd* w pożywce oraz deficytem *Zn* (Papoyan i Kochian, 2004). Lochlainn i inni (2011) wykazali, że w *N. caerulescens* występuje tandemowe zwielokrotnienie (4-krotne) kopii genu *HMA4*. W badaniach z wykorzystaniem GUS (beta-glukuronidazy) pokazano także lokalizację ekspresji *pNcHMA4*:GUS w blaszce liściowej *A. thaliana*, wskazując silną ekspresję promotora *HMA4* z *N. caerulescens* zarówno w wiązkach przewodzących, jak i mezofilu. Ekspresja *pAtHMA4*:GUS, promotora *HMA4* pochodzącego z *A. thaliana* rośliny, która nie posiada zdolności do hiperakumulacji metali, następowała przed wszystkim w komórkach wiązek przewodzących, bez widocznej ekspresji w mezofilu. Zatem lokalizacja ekspresji *HMA4* oraz prowadzony przez białko eksport *Zn* z komórki do apoplastu w określonych tkankach ma znaczącą rolę dla wystąpienia fenotypu hiperakumulacji *Zn* i *Cd*. Podobne wnioski wyciągnięto na podstawie badań *HMA4* z *A. halleri*. Hanikenne i inni (2008) wykazali, poprzez wyciszenie genu *AhHMA4* metodą interferencji RNAi, że hiperakumulacja *Zn* i *Cd* u roślin *A. halleri* wynika z wysokiego poziomu ekspresji *HMA4*. Rośliny z wyciszonym genem *AhHMA4* były wrażliwe na obecność *Cd* oraz nadmiar *Zn*, charakteryzowały się także zmniejszonym transportem *Zn* z korzeni do pędu. W badaniach lokalizacji *Zn* z użyciem fluoroforu Zinpyr 1 pokazano, że u roślin typu dzikiego *A. halleri*, *Zn* w korzeniu jest zgromadzony przede wszystkim w naczyniach ksylemu. Wyciszenie *AhHMA4* prowadzi do wzrostu ilości *Zn* w komórkach miększu ksylemowego, wskazując na ograniczony eksport tego metalu z komórek oraz załadunek do ksylemu. Analiza genomu *A. halleri* oraz funkcjonalna analiza *AhHMA4* wykazała, że obserwowany wzrost ekspresji *AhHMA4* wynika z obecności trzech kopii genu *HMA4* oraz regulacji jego ekspresji typu *cis* (Hanikenne i inni, 2008). Interesujące okazały się także badania mające na celu określenie mechanizmu hiperakumulacji ołowiu w roślinie *Hirschfeldia incana*. Wykazały one, że wzrost akumulacji, translokacji do pędu i tolerancji *Pb* wynika między innymi ze zwiększonej ekspresji genu *HiHMA4*. Co ciekawe, ta sama grupa badawcza wykazała, że mutacja w genie *hma4* u roślin *A. thaliana* prowadzi do zmniejszenia długości korzenia głównego u roślin rosnących w obecności *Pb*, co świadczy o obniżonym poziomie tolerancji na ten metal (Auguy i inni, 2013). W związku z tym wydaje się, że poziom ekspresji *HMA4* odgrywa istotną rolę w regulacji homeostazy metali w roślinie. Wiadomo także, że ściana komórkowa roślin ma duże znaczenie jako miejsce sekwestracji nadmiaru pierwiastków (Krzyszowska, 2011). W *A. halleri* i *N. caerulescens* wykazano wysoki poziom ekspresji odpowiednich ortologów *HMA4* zarówno

w korzeniach, jak i liściach, natomiast u *A. thaliana*, która nie jest hiperakumulatorem metali, poziom ekspresji *AtHMA4* w tych organach jest niski. Wysoki poziom ekspresji *NcHMA4* i *AhHMA4* w liściach może więc przyczyniać się do lepszej detoksykacji Zn i Cd w tych organach poprzez eksport metali do ściany komórkowej (Lochlain i inni, 2011).

Badania nad HMA4 w roślinach niebędących hiperakumulatorami metali, takimi jak topola (*Poplar trichocarpa*), wykazały obniżenie ekspresji *PtHMA4* w odpowiedzi na wzrastające stężenie Zn w pożywce. U topoli z nadekspresją *PtHMA4* z kolei badania wykazały, że nastąpił wzrost biomasy korzeni oraz liści, co przypisano bardziej efektywnemu transportowi Zn do pędu (Adams i inni, 2011). Należy jednak podkreślić, że nie wykonano analizy stężenia Zn w korzeniach i pędzie, co uniemożliwia określenie mechanizmu powstania takiego fenotypu. Najwięcej badań mających na celu określenie roli i funkcji HMA4 przeprowadzono dla genu *AtHMA4* pochodzącego z rośliny, która nie jest hiperakumulatorem tj. *A. thaliana*.

1.4.3. AtHMA4

AtHMA4 jest jednym z ośmiu białek HMA występujących w *A. thaliana* (Mills i inni, 2003). Aby określić funkcję jaką *AtHMA4* może pełnić w komórce, wykonano badania komplementacji mutantów *E. coli* w genach *copA* i *zntA* kodujących białka eksportujące jony miedzi i cynku. Okazało się, że ekspresja *AtHMA4* w mutancie *E. coli zntA* umożliwiła wzrost bakterii w obecności nadmiaru Zn, natomiast nie dawała żadnego efektu w mutancie *copA*, co wskazuje na rolę *AtHMA4* tylko w eksporcie Zn poza komórkę (Mills i inni, 2003). Ekspresja *AtHMA4* w mutantach drożdży *zrc1cot1* hiperwrażliwych na Zn, zniosła ten fenotyp, umożliwiając wzrost drożdży w stężeniu Zn powyżej 300 μ M. Dodatkowo wykazano obniżoną ilość radioaktywnych izotopów Zn^{66} i Cd^{109} w drożdżach z ekspresją *AtHMA4*, co wskazuje na export tych pierwiastków poza komórkę przez białko *AtHMA4* (Mills i inni, 2005). Verret i inni (2004) wskazali, że *AtHMA4* w komórce roślinnej zlokalizowane jest w błonie plazmatycznej, zaś zgodnie z badaniami z wykorzystaniem GUS, jego ekspresja zachodzi specyficznie w komórkach wiązek przewodzących korzeni, pędów i liści.

Opisane powyżej wyniki badań sugerują, że *AtHMA4* odpowiada za eksport Zn w komórkach wchodzących w skład wiązek przewodzących. Eksport Zn z komórek miękiszu ksylemowego prowadzi do wzrostu stężenia Zn w apoplasmie, a co za tym idzie w komórkach ksylemu. Dlatego uznano, iż *AtHMA4* odgrywa główną rolę w załadunku Zn do ksylemu, zaś wysoki poziom ekspresji *AtHMA4* w korzeniach wskazuje, że białko to pełni ważną rolę w regulacji transportu Zn z korzeni do pędów.

Tak jak inne P_{1B}-ATPazy, *AtHMA4* posiada osiem segmentów transbłonowych, a końce C i N umiejscowione są w cytoplazmie. Cechą charakterystyczną i wyróżniającą spośród pozostałych

P_{1B}-ATPaz AtHMA4 i HMA4 z innych organizmów jest wyraźnie dłuższy koniec C zawierający 469 aminokwasów (aac), przy czym koniec C u AhHMA4 posiada 460 aac, u NcHMA4 - 479 aac, u PtHMA4 - 443 aac, natomiast dla innych HMA np. AtHMA1 - 38 aac, AtHMA2 - 257 aac, AhHMA3 - 58 aac, PtHMA1 - 40 aac, AtHMA2 - 250 aac (Zorrig i inni, 2011). Charakterystyczną cechą końca C białka AtHMA4 jest obecność 13 par cystein oraz 11 końcowych histydyn. Wiadomo, że zarówno cysteina, jak i histydyna mają wysokie powinowactwo do Zn oraz Cd. Verret i inni (2005) wykazali, że zamiana cystein z pierwszych dwóch par na serynę w końcu C białka AtHMA4 nie ma wpływu na funkcjonalne zastąpienie przez to białko mutacji *ycf1* w drożdżach (białko YCF1 odpowiada za transport Cd) i *zrc1* (białko ZRC1 odpowiada za transport Zn). Jednak usunięcie z końca C jedenastu następujących po sobie histydyn uniemożliwiło komplementację mutacji *ycf1* i *zrc1* w drożdżach.

Mutacja *hma2* i *hma4* w *A. thaliana* prowadzi do wzrostu stężenia Zn w korzeniach i zmniejszenia stężenia Zn w pędzie (zahamowanie translokacji pęd-korzeń) w takim stopniu, że zaburzony zostaje także wzrost i rozwój roślin. Ekspresja pełnej kopii białka AtHMA4 w mutancie *hma2hma4* *A. thaliana* przywraca translokację Zn z korzeni do pędu, natomiast ekspresja AtHMA4 bez końca C, prowadzi tylko do częściowej zmiany (Mills i inni, 2010). Bækgaard i inni (2010) wskazali, że AtHMA4 posiada na końcu C dziesięć miejsc wiązania Zn lub Cd. W związku z tym, koniec C bez domen transmembranowych (AtHMA4-C) może w komórkach np. drożdży pełnić rolę chelatora Zn lub Cd. Z drugiej strony, ekspresja heterologiczna białka AtHMA4 bez końca C (AtHMA4-T)

w drożdżach, pomimo takiej samej lokalizacji, właściwości kinetycznych oraz poziomu ekspresji jak pełna kopia AtHMA4, zwiększa w drożdżach poziom eksportu obu pierwiastków poza komórki drożdży i tym samym zwiększa ich tolerancję na Zn i Cd (Mills i inni, 2005; Bækgaard i inni, 2010). Jedną z hipotez zakładała, że brak końca C zwiększa efektywność transportu HMA4 (zwiększony poziom eksportu Zn na jednostkę ATP niż w AtHMA4 zawierającej koniec C). Możliwe więc, że koniec C białka AtHMA4 pełni rolę negatywnego regulatora transportu. Jednak taka hipoteza wymaga potwierdzenia w roślinie *A. thaliana* ze względu na możliwość istnienia białek pomocniczych lub innych komponentów, które poprzez interakcję z końcem C białka AtHMA4 mogą wpływać na jego aktywność transportową (Bækgaard i inni, 2010). Podsumowując, znaczenie końca C dla aktywności białka AtHMA4 nie zostało jeszcze dostatecznie wyjaśnione.

Innym ważnym elementem strukturalnym białka AtHMA4 jest koniec N, zawierający nieco zmodyfikowaną w stosunku do innych HMA domenę wiążącą metale (HMA mają motyw GMxCxxC, zaś AtHMA4: GICCTSE). Usunięcie jednej z cystein z motywu GI(CC)TSE powoduje, że ekspresja *AtHMA4* nie prowadzi do komplementacji mutacji w genach *ycf1* i *zrc1* w drożdżach, wskazując na funkcjonalne znaczenie tej domeny na końcu N (Verret i inni, 2005).

Kluczową przeszkodę do pokonania przy próbach zwiększenia akumulacji Zn lub Cd w częściach nadziemnych roślin stanowi bariera w translokacji pierwiastków pomiędzy korzeniem a pędem. Za kontrolę translokacji Zn (oraz Cd) z korzenia do pędu u *A. thaliana* odpowiadają białka HMA2 i HMA4. Wydaje się, że wprowadzenie do roślin tytoniu *AtHMA4*, pod silnym konstytutywnym promotorem, jakim jest CaMV35S, może doprowadzić do zwiększenia translokacji Zn lub Cd z korzenia do pędu.

2. Cel pracy i założenia

Zwiększenie zawartości mikroelementów w jadalnych częściach roślin oraz ograniczenie stężenia pierwiastków toksycznych (biofortyfikacja), jak i oczyszczanie gruntów z metali ciężkich przy użyciu roślin (fitoremediacja) stanowią dwie bardzo intensywnie rozwijające się dziedziny biotechnologii roślin. W obu przypadkach, jedną ze strategii jest stosowanie roślin modyfikowanych genetycznie, które charakteryzują się zmienionym pobieraniem, translokacją do pędu oraz wysokim poziomem akumulacji pierwiastków w tym organie. *AtHMA4* koduje białko należące do podklasy Zn/Cd/Pb/Co P_{1B}-ATPaz będące transporterem jonów Zn²⁺ oraz Cd²⁺, którego funkcją fizjologiczną w roślinie jest załadunek oraz kontrola transportu Zn do ksylemu w korzeniach. Takie właściwości sprawiają, że transformacja tytoniu genem *AtHMA4-F* (nazwa pełnej kopii *AtHMA4* używana w niniejszej pracy doktorskiej) może prowadzić do zwiększenia translokacji Zn i ewentualnie Cd z korzenia do pędu. W związku z tym gen *AtHMA4* jest dobrym kandydatem dla celów biotechnologii do zwiększenia translokacji Zn i Cd do pędu. Rozszerzeniem badań dotyczących ekspresji *AtHMA4-F* w tytoniu jest ekspresja mutantów genu *AtHMA4-F*: *AtHMA4-T* (T- truncated, bez końca C) oraz *AtHMA4-C* (koniec C bez domen transbłonowych). Badanie roślin z ekspresją genu *AtHMA4-T* (bez końca C) miało na celu dostarczenie nowych informacji o znaczeniu końca C dla aktywności białka AtHMA4. Z drugiej strony, ekspresja fragmentu sekwencji *AtHMA4* kodującej jedynie koniec C białka dawała możliwość zbadania wpływu, jaki może mieć wprowadzenie do komórki roślinnej fragmentu białka, którego obecność poprzez wiązanie Zn lub Cd może zmienić zdolność roślin do akumulacji obu metali.

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej miały na celu ocenę przydatności konstruktów *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T* dla celów biotechnologii (modyfikacji dystrybucji korzeń/pęd cynku i kadmu dla potrzeb fitoremediacji oraz biofortyfikacji) poprzez analizę modyfikacji wzoru akumulacji tych metali oraz poznanie mechanizmów generowania fenotypu roślin tytoniu z ekspresją transgenów.

Cel pracy zrealizowano wykorzystując następujące podejście doświadczalne i metody:

I. Materiał badawczy

Badania prowadzono na roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) odmiany Xanthi typu dzikiego oraz na homozygotycznych liniach tytoniu z ekspresją pełnej kopii genu *AtHMA4* (linia *AtHMA4-F*) i dwóch jego wariantów: *AtHMA4-T* (brak końca C; T-truncated) i *AtHMA4-C* (fragmentu sekwencji kodującej koniec C białka AtHMA4, bez domen transbłonowych). Wszystkie konstrukty zostały wprowadzone do roślin tytoniu pod konstytutywnym promotorem CaMV35S.

II. Etapy badań

1. Analizy wstępne

W pierwszej kolejności wykonano badania, które miały na celu sprawdzenie:

- a) poziomu ekspresji transgenów: *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T* - metodą RT-PCR
- b) lokalizacji subkomórkowej *AtHMA4-F* oraz *AtHMA4-C* w transgenicznym tytoniu białka fuzyjnego z *AtHMA4-F-GFP* oraz *AtHMA4-C-GFP* metodą ekspresji przejściowej w liściach.

2. Charakterystyka fenotypu transformantów

Następnym etapem badań była analiza fenotypu roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* i *AtHMA4-T* poprzez określenie poziomu:

- a) akumulacji Zn i Cd
- b) tolerancji na Zn i Cd,

3. Badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu powstawania fenotypu tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*

W tej części pracy wykonano badania, dla poznania mechanizmów generowania w tytoniu zmian indukowanych ekspresją genu *AtHMA4-F*. Przeprowadzone eksperymenty miały na celu weryfikację hipotez stawianych w oparciu o uzyskiwane wyniki. Uzasadnienie dla ich wykonania podano w rozdziałach prezentujących wyniki, a także dalej w dyskusji. W celu przedstawienia w skrócie zakresu pracy poniżej zamieszczono wykaz głównych kierunków badań:

a) Analiza lokalizacji i dystrybucji Zn i Cd:

- na poziomie **subkomórkowym** z wykorzystaniem mikroanalizy rentgenowskiej
- na poziomie **komórkowym**:
 - w symplaście z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 i mikroskopii konfokalnej
 - w symplaście metodą ICP-MS w wyizolowanych protoplastach liściowych
 - w apoplaście metodą ICP-MS w płynie apoplastycznym wyizolowanym metodą infiltracji i wirowania
 - w apoplaście i symplaście rozszerzoną metodą infiltracji i wirowania oraz analizą ICP-MS
- na poziomie **tkankowym** z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1.

- b) Analiza profilu ekspresji genów w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* oraz typu dzikiego rosnących w obecności Cd, metodą analizy mikromacierzowej, wraz z weryfikacją poziomu ekspresji wybranych genów metodą RT-PCR i PCR w czasie rzeczywistym.
- c) Ocena poziomu lignifikacji ścian komórkowych w korzeniach z użyciem: barwnika o-safraniny oraz analizy autofluorescencji lignin.
- d) Ocena poziomu produkcji nadtlenku wodoru w korzeniach metodą DAB
- e) Analiza profilu jonowego w pędach i korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na Cd z wykorzystaniem metody ICP-MS.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej eksperymenty jako jedne z niewielu miały za zadanie nie tylko charakterystykę fenotypu roślin tytoniu transformowanych poszczególnymi wariantami genu *AtHMA4*, ale także wskazanie mechanizmu powstawania obserwowanych zmian.

Otrzymane rezultaty będą miały istotny wkład w badania nad możliwością wykorzystania *AtHMA4* do modyfikacji roślin dla potrzeb biofortyfikacji i fitoremediacji poprzez wskazanie procesów, które uległy zmianie w wyniku transformacji.

3. Materiały i Metody

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał roślinny

Doświadczenia przeprowadzono na roślinach tytoniu *Nicotiana tabacum* odmiany Xanthi, typu dzikiego oraz transformowanych genami:

- AtHMA4-F* – koduje pełną kopie białka AtHMA4 (Fig. 2a)
- AtHMA4-C* – koduje koniec C białka AtHMA4 bez domeny transbłonowej (Fig. 2b)
- AtHMA4-T* – koduje białko AtHMA4 bez końca C (Fig. 2c)

Geny *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C* zostały sklonowane w plazmidzie pBECK pod promotorem CaMV 35S natomiast gen *AtHMA4-T* sklonowano w plazmidzie pGREEN także pod promotorem CaMV 35S. Klonowanie przeprowadzono na Uniwersytecie Southampton przez zespół dr L. Williams i dr R. Mills. Wszystkie transformowane rośliny miały w obrębie sekwencji T-DNA gen *nptII* kodujący fosfotransferazę neomycyny, nadający oporność na kanamycynę, antybiotyk używany podczas selekcji transformantów.

Transformację wyżej wymienionymi genami metodą krążków liściowych (Horsch i inni, 1985) z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* wykonała mgr Agnieszka Godoń w ramach projektu 6 PR UE PHIME (**P**ublic **H**ealth **I**mpact of long-term, low level **M**ixed **E**lement exposure in susceptible population strata).

- Fazę wstępną doświadczeń przeprowadzono na pokoleniu heterozygotycznym T₁. Stosowane linie roślin transgeniczných o wzorze segregacji 3:1 (rośliny odporne:wrażliwe na kanamycynę). Zgodnie z prawem Mendla wzór segregacji 3:1 wskazuje na obecność 1 kopii transgeny. Do doświadczeń użyto następujących niezależnych linii roślin transgeniczných:
- 7 linii *AtHMA4-F* o numerach: 4, 5, 9, 11, 16, 17, 18
 - 9 linii *AtHMA4-C* o numerach: 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 21
 - 8 linii *AtHMA4-T* o numerach: 5, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 18

Eksperymenty prowadzone na dużej liczbie linii, pozwoliły na oddzielenie efektów działania transgeny od zmienności pomiędzy liniami wynikającej ze specyfiki procesu

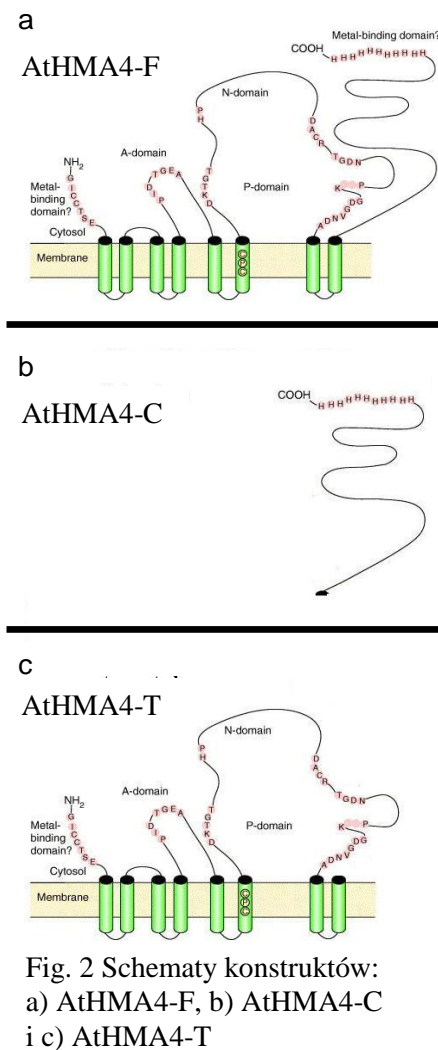


Fig. 2 Schematy konstrukcji:
a) AtHMA4-F, b) AtHMA4-C
i c) AtHMA4-T

transformacji (zmienność somaklonalna, różny poziom ekspresji transgenu i lokalizacja w obrębie genomu tytoniu). Do szczegółowych badań, które są przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyprowadzono z wybranych linii heterozygotycznych po 4 linie homozygotyczne:

- *AtHMA4-F* oznaczone numerami: 4, 5, 9, 18
- *AtHMA4-C* oznaczone numerami: 6, 14, 16, 21
- *AtHMA4-T* oznaczone numerami: 5, 9, 12, 16

3.1.2. Szczepy bakteryjne

- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (C58C1, Rif^R; pMP90, Gm^R)
- *Escherichia coli* DH5α [K12, *supE44*, *lacU169* (Φ80d*lacZ*Δ*M15*), *hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)

3.1.3. Plazmidy i stosowane konstrukty

Do doświadczeń mających na celu określenie w tytoniu lokalizacji komórkowej białka kodowanego przez wprowadzony gen zastosowano przejściową ekspresję białek fuzyjnych *AtHMA4-F:GFP* oraz *AtHMA4-C:GFP*. Do transformacji użyto: pMDC43-35S:AtHMA4-F i pMDC43-35S:AtHMA4-C (Wielkość plazmidu ok. 14,3 kb). Oba konstrukty są odpowiednie do przeprowadzenia ekspresji przejściowej przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* i zawierają w obrębie sekwencji geny warunkujący odporność na kanamycynę, rifampicynę i gentamycynę.

Konstrukt 35S:AtHMA4-F:GFP przygotowała dr Lorraine Williams i dr Rebecca Mills z Uniwersytetu w Southampton. Konstrukt 35S:AtHMA4-C:GFP przygotowała dr Sylwia Wojas w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin UW.

3.1.4. Pożywki do hodowli bakterii

Skład stosowanych pożywek:

YEP

Pepton	10 g/l
Ekstrakt drożdżowy	10 g/l
NaCl	5 g/l

Do pożywek stałych używano agaru (Biocorp) w ilości 20 g/l (2%).

YEB

Ekstrakt drożdżowy	1 g/l
Ekstrakt wołowy	5 g/l
Pepton	5 g/l
Sacharoza	5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
pH = 7 (KOH/HCl)	

LB

Trypton	10 g/l
Ekstrakt drożdżowy	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH = 7 (KOH/HCl)	

Do pożywek stałych używano agaru (Biocorp) w ilości 15 g/l (1,5%).

SOB

Trypton	20 g/l
Ekstrakt drożdżowy	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl (250mM)	10 ml/l
pH =7 (KOH/HCl)	

Bezpośrednio przed użyciem do 1 litra pożywki dodawano 5 ml sterylnego 2 M roztworu MgCl₂.

3.1.4.1. Antybiotyki

Gentamycyna: roztwór wyjściowy 20 mg/ml w H₂O przechowywany w -20°C, stosowana w stężeniu 5 µg/ml do selekcji *Agrobacterium* GV3101, zawierającego plazmid Ti niosący oporność na ten antybiotyk.

Kanamycyna: roztwór wyjściowy 50 mg/ml w 50% (v/v) EtOH przechowywany w -20°C, stosowana w stężeniu 50 µg/ml do selekcji bakterii (*E.coli* i *A.tumefaciens*) posiadających plazmid pGreen i pGPTV.

Rifampicyna: roztwór wyjściowy 25 mg/ml w DMSO, przechowywany w -20°C, stosowana w stężeniu 50 µg/ml do selekcji szczepu *Agrobacterium* GV3101.

3.1.4.2. Sposób przygotowania pożywek

Wszystkie składniki pożywki (z wyjątkiem antybiotyków) rozpuszczano w odpowiedniej objętości wody dejonizowanej oraz ustalano pH (przy użyciu KOH lub HCl). Następnie pożywki rozlewano do szklanych kolb Erlenmeyera. W przypadku podłoży stałych, do kolby dodawano uprzednio odważony agar. Pożywki poddawano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut. Przy przygotowywaniu podłoży stałych, po schłodzeniu pożywki do około 50°C, uzupełniano ją odpowiednim zestawem antybiotyków i rozlewano do

sterylnych szalek Petri'ego. Natomiast w przypadku pożywek płynnych antybiotyki dodawano bezpośrednio przed zaszczepieniem hodowli bakteryjnej.

3.1.5. Pożywki do hodowli roślin

3.1.5.1. Skład stosowanych pożywek

Pożywka Knop'a

Makroelementy (stężenia robocze):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	3 mM
KNO_3	1.5 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.25 mM
KH_2PO_4	1 mM

Mikroelementy (stężenia robocze):

EDTA-Fe	40 μM
H_3BO_3	25 μM
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2 μM
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2 μM
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,1 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 μM
KJ	5 μM
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 μM

Aby zapobiec wytrącaniu się mikroelementów roztwór był zakwaszany HCl. W razie potrzeby pożywkę Knop'a zestalano agarem (Sigma) w ilości 10 g/l (1 %).

3.1.5.2. Czynniki selekcyjne

Kanamycyna: stosowano roztwór o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ do selekcji roślin z ekspresją transgenu w populacji roślin linii heterozygotycznych, roztwór wyjściowy 50 mg/ml (v/v) EtOH, przechowywany w -20°C .

3.1.5.3. Sposób przygotowania pożywek

W przypadku pożywek stałych do hodowli roślin *in vitro*, wszystkie składniki pożywki rozpuszczano w odpowiedniej objętości wody dejonizowanej. Następnie pożywki rozlewano (z wyjątkiem czynników selekcyjnych) do kolb, zawierających uprzednio odważony agar. Pożywki poddawano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut. Po schłodzeniu pożywki do temperatury około 50°C , dodawano czynnik selekcyjny i rozlewano pożywkę do sterylnych szalek Petriego.

Pożywkę płynną Knop'a (używaną do hodowli roślin w kulturach hydroponicznych) przygotowywano na bazie wody destylowanej i sterylnych roztworów wyjściowych poszczególnych makroelementów (przygotowanych osobno dla każdej ze stosowanych soli,

stężenie wyjściowe: 200x i mikroelementów (jeden roztwór zawierający wszystkie sole mikroelementów z wyjątkiem Fe-EDTA, stężenie wyjściowe: 1000x; dodatkowo roztwór Fe-EDTA, stężenie wyjściowe: 1000x).

3.1.6. Odczynniki

Do doświadczeń używano odczynników wyłącznie o wysokiej klasie czystości (cz.d.a., pure, ultrapure). Producenci większości stosowanych chemikaliów to Sigma, Fluka, Merck i POCH (Polskie Odczynniki Chemiczne).

3.2. Metody

Sposób oraz czas hodowli roślin, jest opisany dla każdego z kolejno opisanych doświadczeń w poszczególnych podrozdziałach. W każdym jednak wypadku do doświadczeń wybierano rośliny w podobnym stadium rozwojowym.

3.2.1. Sterylizacja nasion

Nasiona sterylizowano w sterylnych probówkach Eppendorfa. Nasiona przemywano 70% alkoholem etylowym przez 2-3 sekundy, następnie przez 4 minuty sterylizowano w roztworze podchlorynu sodu: woda (1:3) (użyto produktu handlowego ACE: 5% podchloryn sodu, 1% wodorotlenek sodu, 5% węglan sodu) i płukano 6-7 krotnie sterylną wodą dejonizowaną.

3.2.2. Hodowla roślin na szalkach Petri'ego

Stosowano pożywkę Knop'a ($\frac{1}{4}$ stężenia pełnej pożywki), zestaloną 1% agarem, z dodatkiem 2% sacharozy. Rośliny transformowane miały gen *nptII* kodujący fosfotransferazę neomycyny, nadający oporność na kanamycynę. Rośliny, które nie uległy transformacji oraz w procesie dziedziczenia nie uzyskały transgenu nie mogły się rozwijać w obecności kanamycyny. Dzięki analizie segregacji można określić czy dziedziczenie cech (oporności na kanamycynę) było zgodne z prawem Mendla, a co za tym idzie nastąpiło wprowadzenie tylko jednej kopii transgenu. Analizę wzoru segregacji w pokoleniu heterozygotycznym roślin tolerancyjnych/opornych na kanamycynę przeprowadzano hodując rośliny na pożywce zestalonej agarem zawierającej 100 mg/ml roztworu kanamycyny.

Wysterylizowane nasiona tytoniu wysiewano przy pomocy pipety Pasteur'a na szalki - około 30-50 nasion na szalkę. Szalki zabezpieczone parafilmem ustawiano pionowo w komorze fitotronowej (fotoperiod 16 h dzień / 8 h noc, średnia temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, natężenie światła $250 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, wilgotność powietrza 30-50%). Możliwość wzrostu roślin w obecności kanamycyny

stwierdzano po ok. 2 tygodniach. Siewki niewykazujące odporności na kanamycynę były mniejsze i miały żółte liścienie oraz mały korzeń. Rośliny typu dzikiego hodowano w sposób opisany powyżej na pożywce bez dodatku kanamycyny. Uzyskane siewki przenoszono po 2 tygodniach do kultur hydroponicznych w celu dalszej hodowli.

3.2.3. Hodowla hydroponiczna

Rośliny przeniesione z agaru hodowano w komorze fitotronowej na pożywce Knop'a (1/4 stężenia pełnej pożywki) w pudełkach o pojemności 1,75 i 2,5 l. Rośliny hodowano w komorze fitotronowej przy fotoperiodzie 16 h dzień / 8 h noc, średniej temperaturze $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, natężeniu światła $250\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ oraz wilgotności powietrza 30-50%. Schematy hodowli hydroponicznej zależały od rodzaju doświadczeń, dlatego są one przedstawiane przy ich opisie.

3.2.4. Badania poziomu ekspresji transgenów (*AtHMA4*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T*) w tytoniu

Analizę poziomu ekspresji genów *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* i *AtHMA4-T* wykonano metodą RT-PCR (ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Badania wykonano w celu potwierdzenia obecności wprowadzonych genów w roślinach transformowanych. RT-PCR jest półilościową metodą analizy poziomu transkryptu opartą na reakcjach: (1) odwrotnej transkrypcji mRNA oraz (2) amplifikacji wybranego odcinka cDNA badanego genu metodą PCR (Polymerase Chain Reaction) i składa się z etapów: (i) izolacja RNA, (ii) trawienie DNA, (iii) reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) (iv) PCR na matrycy cDNA otrzymanej w wyniku reakcji RT oraz (v) rozdzielenie produktów reakcji PCR poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Jako kontrolę równej ilości RNA użytej w każdej reakcji, wykorzystano produkt amplifikacji cDNA genu *Tac9* z tytoniu, kodującego aktywną. Szczegóły postępowania opisano w podrozdziałach poniżej.

3.2.4.1. Izolacja RNA

Świeżą tkankę liści ucierano w ciekłym azocie i przechowywano w probówkach Eppendorfa w -70°C . Z około 100 mg tkanki roślinnej izolowano RNA, przy użyciu zestawu RNeasy Plant Mini Kit firmy QIAGEN (wg protokołu producenta dołączonego do zestawu). Po izolacji określano ilość RNA i jego czystość na podstawie pomiarów absorbancji przy 260 i 280 nm, korzystając z biofotometru firmy Eppendorf. Jedna jednostka absorbancji przy 260 nm odpowiada stężeniu RNA równemu $40\ \mu\text{g/ml}$ (Sambrook i inni, 1989). Czystość RNA oceniano na podstawie stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm. Przyjmuje się, że roztwór wodny czystego RNA daje stosunek A_{260}/A_{280} w granicach 1,5-1,9. Niższe wartości wskazywać mogą na obecność w próbce innych związków absorbujących UV, np. białek (Sambrook i inni, 1989).

3.2.4.2. Trawienie DNA w próbkach otrzymanego RNA

Trawienie DNA w próbkach otrzymanych po izolacji RNA wykonano w celu wyeliminowania matrycy DNA dla reakcji PCR. Obecność dodatkowej matrycy DNA dla reakcji PCR jaką byłby materiał DNA wyizolowany z rośliny mógłby wpływać na zafałszowanie wyników analizy poziomu ekspresji. Do reakcji stosowano 20 µg RNA na jednostkę DN-azy (RQ1 RNase-free DNase firmy Invitrogen, 1u/µl) w roztworze z 10x buforem DN-azy (tej samej firmy). Degradacja DNA przebiegała w temperaturze 42°C przez 1 godzinę. Reakcję kończono dodając bufor Stop 10 x (RQ1 DNase STOP), a próbki w razie potrzeby przechowywano w temperaturze -20 °C. Jakość RNA sprawdzano na żelu agarozowym.

3.2.4.3. Reakcja RT

Do reakcji RT (Reverse Transcription – odwrotna transkrypcja) stosowano 4 µl RNA (po trawieniu DNA) wraz z następującymi odczynnikami:

- bufor 5x M-MuLV RT (250 mM Tris-HCl pH=8,3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 50 mM Ditiotritol) (Fermentas)
- dNTP 10 mM (deoxyNucleoside TriPhosphate, mieszanina deoksynukleotydów Fermentas)
- inhibitor rybonukleazy (Riblock) 40 u/µl (Fermentas)
- Odwrotna transkryptaza RevertAid M-MuLV 20 u/µl (Fermentas)
- Oligo d(T)₁₈ starter 1 µl (Fermentas)
- Woda DEPC (ang. DiEthylPyroCarbonate, eter dietylowy kwasu pirowęglowego)

Reakcja RT umożliwia przepisanie sekwencji nukleotydów mRNA na cDNA. Procedurę RT wykonano z zastosowaniem dwóch prób kontrolnych:

- ✓ dla próbki z matrycą RNA bez dodawania odwrotnej transkryptazy i starterów Oligo d(T)₁₈ (kontrola mająca na celu wykazanie czy w materiale RNA obecne jest DNA)
- ✓ próba odczynnikowa - bez matrycy RNA (kontrola czystości odczynników na obecność RNA)

Odwrotna transkryptaza wymaga startera do rozpoczęcia syntezy pierwszej nici cDNA. Zastosowano starter oligo(dT)₁₈ (0,5 µg/ reakcję), wykazujący zdolność selektywnego łączenia się z mRNA posiadający ogon poliA. 1 µl startera oligo(dT)₁₈ wraz z odpowiednią ilością wody (dającą wraz z dodawanym później roztworem RNA objętość 9 µl) inkubowano w probówce Eppendorfa przez 5 minut w 70°C. Mieszaninę przenoszono na lód i dodawano kolejno roztwór RNA, 4 µl buforu 5x, 1 µl inhibitora rybonukleazy i 2 µl 10 mM dNTP, a następnie inkubowano przez 5 minut w 42°C, po czym dodawano odwrotną transkryptazę w ilości 40 jednostek/reakcję. Reakcja przepisywania mRNA na cDNA przebiegała przez 1 godzinę w 42°C. Następnie zatrzymywano reakcję poprzez inaktywację enzymu w 70°C przez 10 minut.

3.2.4.4. Reakcja PCR

Do reakcji PCR używano 2 μ l roztworu cDNA, uzyskanego w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji.

Stosowano zestaw do reakcji PCR firmy Fermentas, zawierający następujące odczynniki (w nawiasach podano stężenia wyjściowe stosowanych roztworów):

- bufor reakcyjny stężony 10x (100 mM Tris-HCl pH 8.8; 500 mM KCl; 0.8% Nonidet P40)
- roztwór $MgCl_2$ stężony 10x (25 mM)
- dNTP (2 mM)
- polimerazę Taq (5 u/ μ l).

Reakcję przeprowadzano w objętości 25 μ l, o następujących składnikach mieszaniny reakcyjnej:

- bufor reakcyjny stężony 10x	- 2 μ l
- roztwór $MgCl_2$ stężony 10x	- 2 μ l
- dNTP (2 mM)	- 2 μ l
- starter forward	- 0,5 μ l
- starter revers	- 0,5 μ l
- H_2O	- 15,9 μ l
- polimerazę Taq	- 0,1 μ l
- metryca cDNA	- 2 μ l
suma:	- 25 μ l

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Eppendorf Mastercycler (Eppendorf) stosując następujące parametry reakcji:

94°C - 3 minuty – 1x	
94°C	} po 30 sekund (25-30 cykli)
51- 54°C	
72°C	
72°C - 7 minut – 1x	
4°C – zakończenie reakcji	

Po reakcji przeprowadzono elektroforezę otrzymanych próbek na 1 % (w/v) żelu agarozowym z bromkiem etydyny (0,5 μ g/ml). Stosowano marker wielkości firmy Fermentas (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus).

Sekwencje starterów używanych do reakcji PCR projektowano przy użyciu dostępnych w internecie programów Primer-BLAST i PRIMER. Syntezę starterów wykonała na zlecenie firma Genomed. Używano starterów o następujących sekwencjach:

Dla genów *AtHMA4* (acc no. AJ297264) i *AtHMA4-T*:

Starter lewy: 5' TCGTGGATTATG CAAAATCTG 3'

Starter prawy: 5' GTCCAGAATCATACAAGAGTT 3'

Wielkość produktu dla genu kodującego *AtHMA4* i *AtHMA4-T*: 430 pz.

Dla genu *AtHMA4-C*:

Starter lewy: 5' AGAAATCAGAGGGAGATATGG 3'

Starter prawy: 5' GGAAGAGACAGATGATCAAGA 3'

Wielkość produktu dla genu kodującego *AtHMA4-C*: 529 pz.

Dla genu *NtTac9* (acc no. X69885):

Starter lewy: 5' CCTCCCACATGCTATTCTCC 3'

Starter prawy: 5' AGAGCCTCCAATCCAGACAC 3'

Wielkość produktu dla genu kodującego aktywny: 523 pz.

3.2.5. Określenie lokalizacji białek fuzyjnych *AtHMA4-F-GFP* oraz *AtHMA4-C-GFP* w komórkach tytoniu

W wyniku ekspresji heterologicznej genu *AtHMA4-F* lokalizacja komórkowa kodowanego białka może być inna niż w roślinie z której ono pochodzi. Celem badań było potwierdzenie czy białko *AtHMA4-F* w roślinie transformowanej lokalizuje się, tak jak w roślinie macierzystej, w plazmolemie.

W tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C*, kodującego C-koniec białka *AtHMA4* (pozbawionego sekwencji transbłonowych) przeprowadzono badania dla ustalenia miejsca jego lokalizacji w komórkach transformantów.

W celu określenia lokalizacji subkomórkowej białka kodowanego przez *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C* zastosowano metodę ekspresji przejściowej białka fuzyjnego *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C* z białkiem zielonej fluorescencji GFP. Do ekspresji przejściowej stosowano gotowe konstrukty:

- I. *pMDC43/AtHMA4-F-GFP* uzyskano od Lorraine Willimas (Uniwersytet w Southampton),
- II. *pMDC43/AtHMA4-C-GFP*, który został wykonany w ramach grupy badawczej prof. Antosiewicz przez dr Sylwię Wojaś.

W obu przypadkach zastosowano promotor konstytutywny CaMV35S.

3.2.5.1. Ekspresja przejściowa metodą infiltracji liści tytoniu

Jedną z metod uzyskania przejściowej, wysokiej ekspresji transgenu jest infiltracja liści tytoniu zawieszoną komórek *Agrobacterium*, zawierających odpowiedni konstrukt.

W celu określenia lokalizacji AtHMA4-F-GFP i AtHMA4-C-GFP w tytoniu zastosowano protokół wg Sparkes i inni (2006):

W pierwszym etapie wykonano transformację *Agrobacterium tumefaciens* plazmidowym DNA niosącym *AtHMA4-F-GFP* i *AtHMA4-C-GFP* zgodnie z następującą procedurą:

1. 50 μ l elektrokompetentnych, rozmrożonych na lodzie, bakterii *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 przeniesiono do schłodzonej sterylnej kувety do elektroporacji.
2. Dodano 2 μ l plazmidowego DNA (konstrukty: *pMDC43/AtHMA4-F-GFP* lub *pMDC43/AtHMA4-C-GFP*).
3. Kувetę z komórkami bakterii przeniesiono do elektroporatora (Eppendorf) i poddano działaniu impulsu elektrycznego o następujących parametrach: 200 Ω , 25 μ F, 2,5 kV.
4. Natychmiast po inkubacji dodano do kувety 700 μ l podłoża YEP, inkubowano 2 godz. w 28°C z intensywnym (250 rpm) wytrząsaniem.
5. Bakterie wysiano powierzchniowo na szalki z podłożem stałym YEP, uzupełnionym:
 - a) kanamycyną (50 μ g/ml) - w celu selekcji bakterii zawierających stosowane konstrukty: *pMDC43/AtHMA4-F-GFP* lub *pMDC43/AtHMA4-C-GFP*,
 - b) rifampicyną (50 μ g/ml) i gentamycyną (5 μ g/ml) w celu selekcji bakterii *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mających oporność na oba antybiotyki (C58C1, Rif^R; pMP90, Gm^R)
6. W celu otrzymania kolonii inkubację szalek prowadzono w temperaturze 28°C przez 2-3 dni.

Kolejne etapy prowadzące do uzyskania zawiesiny komórkowej gotowej do przeprowadzenia transformacji przejściowej to:

- a. Nastawienie tak zwanej „nocnej hodowli” (inkubacja przez noc - ok. 16-20 godz.) *Agrobacterium* z potwierdzoną obecnością plazmidów (wzrost na kanamycynie) na podłożu płynnym YEP z dodatkiem kanamycyny (50 μ g/ml), rifampicyny (50 μ g/ml) i gentamycyny (5 μ g/ml).
- b. Następnego dnia przy użyciu 2 ml hodowli zaszczepiono *Agrobacterium* świeże podłoże płynne YEB z dodatkiem odpowiednich antybiotyków (j.w.) i pozostawiano na hodowlę nocną.
- c. W kolejnym dniu rozlano hodowlę do probówek typu Falcon o objętości 50 ml i zwirowano przy 1000 g przez 10 minut. Usunięto supernatant, bakterie zawieszono w 20 ml buforu do infiltracji o składzie: 50 mM kwas 2-morfolino-etanosulfonowy (MES), 2 mM Na₃PO₄·12H₂O, 0,5%

(w/v) glukoza, 100 μ M acetosyringon (związek fenolowy indukujący geny wirulencji *Agrobacterium*, niezbędne do transferu kasety transformacyjnej).

- d. Próbówkę z zawiesiną bakterii ponownie zwirowano i zawieszono w 20 ml buforu do infiltracji - ten etap powtórzono dwukrotnie, w celu dokładnego usunięcia resztek antybiotyków.
- e. Otrzymaną hodowlę bakterii zawieszono w buforze do infiltracji, tak, aby końcowe OD₆₀₀ wynosiło 0,1.

W celu transformacji przejściowej tytoniu używano liści z 5-tygodniowych roślin. Nakłuwano je delikatnie cienką igłą w miejscu planowanej infiltracji i infiltrowano tkanki uzyskaną zawiesiną bakterii, przy użyciu strzykawki o pojemności 10 ml. Po 4 dniach fragmenty liści umieszczano na szkiełku podstawowym i obserwowano pod mikroskopem konfokalnym.

3.2.6. Analiza poziomu akumulacji i tolerancji na cynk i kadm roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* i *AtHMA4-T* – testy w kulturach hydroponicznych

3.2.6.1. Inkubacja z chlorkiem cynku i kadmu

W celu określenia, czy ekspresja *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* i *AtHMA4-T* w tytoniu wpływa na zmianę akumulacji, dystrybucji korzeń/pęd oraz tolerancji na Zn i Cd przeprowadzono eksperymenty w kulturach hydroponicznych. Rośliny poszczególnych linii hodowane były według schematów przedstawionych na Fig. 3 i 4.

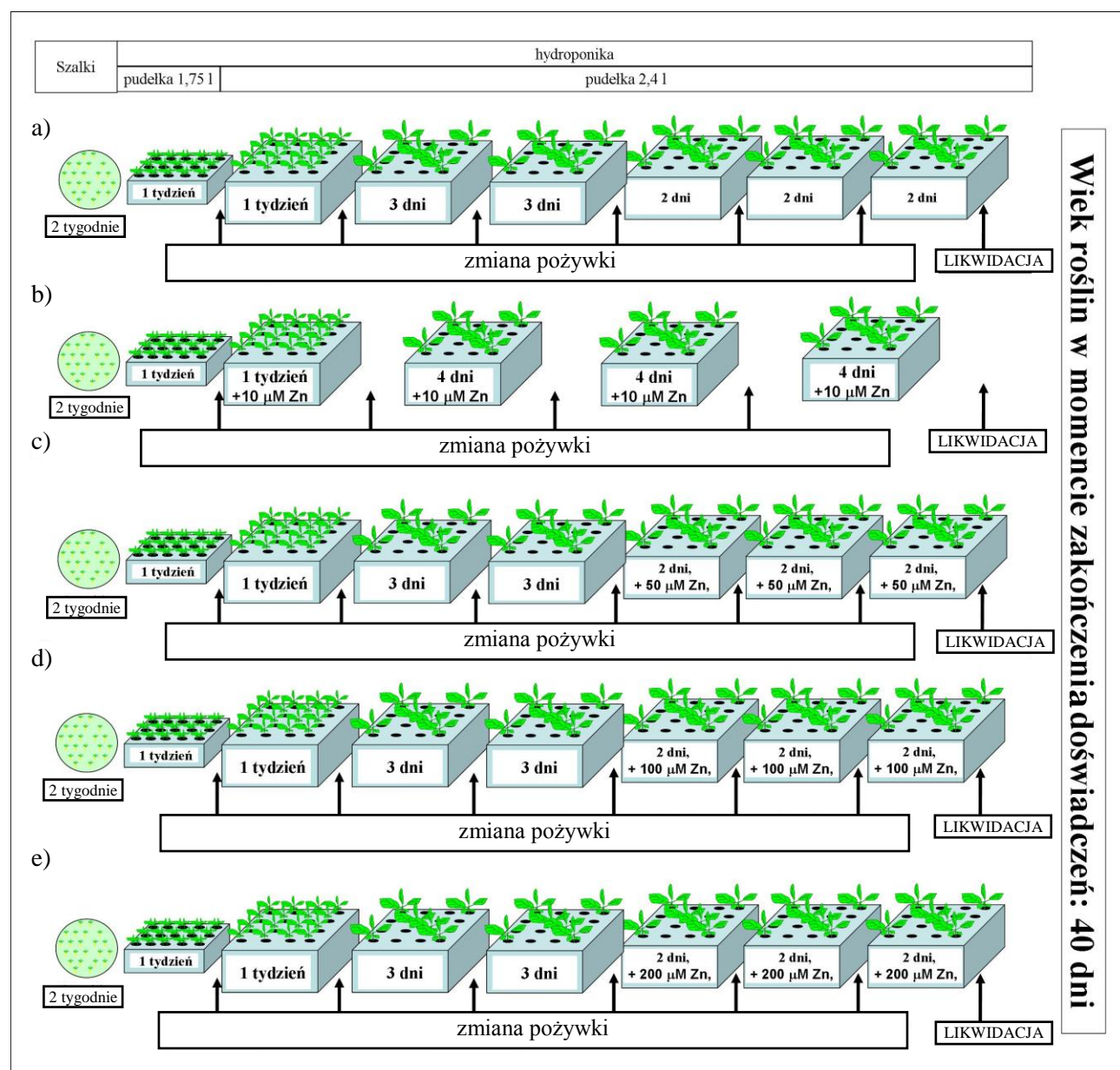


Fig. 3. Schematy hodowli roślin rosnących na kontrolnej pożywce $\frac{1}{4}$ Knop'a uzupełnionej różnymi stężeniami Zn: a) 0,5 µM Zn (kontrolna pożywka $\frac{1}{4}$ Knop'a), b) 10 µM Zn, c) 50 µM Zn, d) 100 µM Zn i e) 200 µM Zn. Rośliny wysiewano na pożywkę $\frac{1}{4}$ Knop'a zestaloną agarem, siewki po ok. 2 tygodniach przenoszono do pudełek o pojemności 1,75 l (etap gdzie rozpoczynano ekspozycję na 10 µM), kolejno po tygodniu przenoszono siewki do pudełek 2,4 l a następnie po 2 zmianach pożywki co 3 dni rozpoczynano hodowlę roślin w obecności różnych stężeń Zn.

Rośliny 5 tygodniowe (stadium 5 liści, wyhodowane według procedury przedstawionej w rozdziale 3.2.2. i 3.2.3) poddawano ekspozycji na Zn w stężeniach 0,5 μM (stężenie Zn w kontrolnej pożywce $\frac{1}{4}$ Knop'a) oraz 10, 50, 100 i 200 μM ZnCl_2 ; a także 0,25 i 5 μM CdCl_2 .

Dla oceny poziomu tolerancji na wysokie stężenia Zn i Cd, w trakcie trwania oraz na końcu doświadczeń oceniano stan roślin poprzez ocenę bonitacyjną objawów toksyczności (wykonywano również dokumentację fotograficzną wyglądu roślin).

Po zakończeniu inkubacji, przed zebraniem materiału, przeprowadzano desorpcję luźno związanych w obrębie ściany komórkowej jonów Zn^{2+} i Cd^{2+} przy użyciu 5 mM CaCl_2 . W tym celu przepłukane wodą destylowaną korzenie zanurzano na 10 minut w schłodzonym na lodzie 5 mM CaCl_2 . Następnie płukano je dwukrotnie w wodzie destylowanej o temp. pokojowej, delikatnie osuszano na bibule filtracyjnej i odcinano pędy. Korzenie i pędy suszono do suchej masy (przez 3 dni w 55°C) i ważono. Następnie pędy i korzenie roślin mineralizowano i określano stężenie Zn w tych organach metodą atomowej spektroskopii absorbcyjnej (ASA).

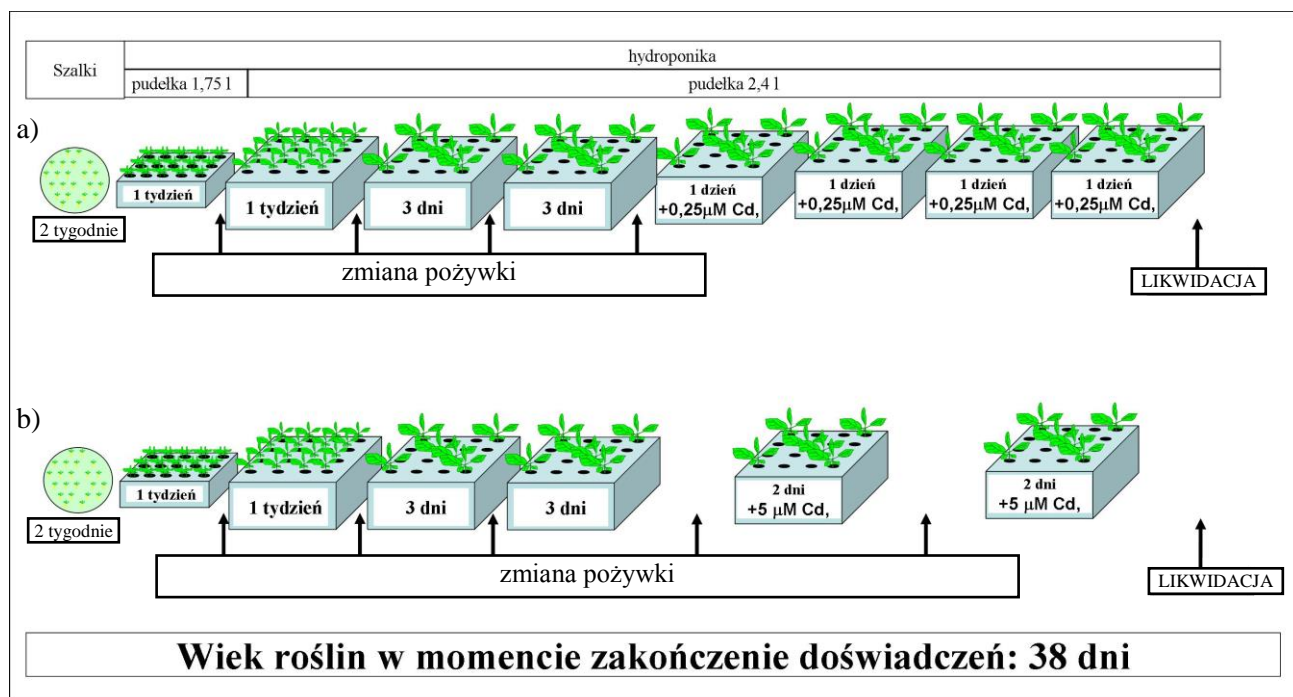


Fig. 4. Schematy hodowli roślin rosnących na kontrolnej pożywce $\frac{1}{4}$ Knop'a uzupełnionej różnymi stężeniami Cd: a) 0,25 μM Cd i b) 5 μM Cd. Rośliny wysiewano na pożywkę $\frac{1}{4}$ Knop'a zestawioną agarem, siewki po ok. 2 tygodniach przenoszono do pudełek o pojemności 1,75 l, kolejno po tygodniu przenoszono siewki do pudełek 2,4 l a następnie po 2 zmianach pożywki co 3 dni rozpoczynano hodowlę roślin w obecności różnych stężeń Cd.

3.2.6.2 Oznaczenia stężenia cynku i kadmu w materiale roślinnym metodą ASA i ICP MS

Wysuszone do stałej masy próby roślin używano w całości do mineralizacji. Jedynie w przypadkach gdy ich masa przekraczała 0,5 g, próbki mielono w moździerzu agatowym lub młynku analitycznym (zależnie od wielkości i charakteru próbki) ujednolicano mieszając a do mineralizacji używano naważek. Mineralizację prowadzono w naczyniach teflonowych z dodatkiem odpowiedniej ilości mieszaniny 69% HNO₃ oraz 35% H₂O₂ (9:1 w/v), w mineralizatorze mikrofalowym (Microwave Labstation- ETHOS, Milestone) zgodnie z zalecanym programem. Objętość mieszaniny stosowana do mineralizacji wynosiła dla próbek o masie: (i) poniżej 0,1g = 3 ml, (ii) ponad 0,1 g = 5 ml.

Stężenie cynku i kadmu w materiale roślinnym oznaczano przy użyciu spektrometru absorpcji atomowej (TJA Solutions, Solar M) metodą płomieniową. Ocenę dokładności metody oznaczania zawartości cynku i kadmu dokonano przy zastosowaniu materiału referencyjnego CTA-VTL-2 – liści tytoniu Virginia (zawartość kadmu 1.52±0.17 mg/kg s.m., zawartość cynku 43,3±2,1 mg/kg s.m). Wyniki analiz stężeń badanych pierwiastków w materiale wzorcowym mieściły się w zalecanym zakresie zgodności.

Profil jonowy - Analizę stężenia pierwiastków wykonano używając spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS) z wykorzystaniem kwadrupolowego spektrometru mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej model Elan 9000 (Perkin Elmer Sciex, Kanada) (Salt i inni, 2008). Do badań wykorzystano zmineralizowany materiał z korzeni i pędów roślin hodowanych w warunkach kontrolnych i obecności 0,25 µM Cd przez 4 dni. Mineralizaty rozcieńczono:

- 15-razy do oznaczeń: Al., B, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Mo, Zn,
- 300-razy do oznaczeń: Ca, Mn, Mg

- Do oceny dokładności analizy ICP-MS wykorzystano certyfikowany materiał referencyjny SWR-2 Trace Elements in Water (NIST, USA). Wyniki analizy stężenia cynku w materiale wzorcowym mieściły się w zalecanym zakresie zgodności. Profil jonowy wykonano dla próbek pobranych z 6 roślin transgeniczných i typu dzikiego, analizę przeprowadzono dla dwóch powtórzeń biologicznych.

3.2.7. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym, komórkowym (apoplast/sympast) oraz w organach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C*

3.2.7.1. Lokalizacja Zn i Cd na poziomie subkomórkowym – mikroanaliza rentgenowska EDX (energy dispersive microanalysis)

Aby określić czy ekspresja *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C* prowadzi do zmiany lokalizacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym w epidermie, korze pierwotnej oraz walcu osiowym korzeni

5-tygodniowych roślin hodowanych przy różnych stężeniach Zn i Cd, wykonano badania techniką mikroanalizy rentgenowskiej. W celu uniknięcia wypłukania i re-translokacji pierwiastków w obrębie komórek i tkanek korzeni, badany materiał roślinny został przygotowany następującymi metodami:

- a. zamrażanie próbek pod wysokim ciśnieniem (high pressure-freezing)
- b. odwadnianie w niskiej temperaturze (freeze substitution).
- c. zatapianie materiału roślinnego w żywicy Spura

Tę część badań wykonano w ramach złożonego i otrzymanego grantu STSM (Short Therm Scientific Mission) w Belgii na Uniwersytecie w Hasselt i Gandawie w ramach Akcji COST 859.

Ekspozycja roślin na Zn i Cd

Schemat hodowli roślin przedstawiono w rozdziale 3.2.6.1 Fig. 3 a, d oraz Fig. 4 a i b. 5-tygodniowe rośliny tytoniu hodowane w warunkach hydroponicznych zostały poddane ekspozycji na:

- Zn^{2+} (jako ZnCl_2) – 5-tygodniowe rośliny przenoszono na 6 dni do pożywki zawierającej $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$.
- Cd^{2+} (jako CdCl_2) - 5-tygodniowe rośliny przenoszono na 6 dni do pożywki zawierającej $5 \mu\text{M Cd}^{2+}$.
- kontrola – rośliny rosły w $\frac{1}{4}$ stężenia pożywki Knopa ($0,5 \mu\text{M Zn}^{2+}$ jako ZnSO_4).

a. Zamrażanie próbek pod wysokim ciśnieniem (high pressure-freezing)

Po zakończeniu inkubacji w obecności Zn bądź Cd, z każdej rośliny pobierano z 3-ch różnych roślin próbki:

- I. fragmenty (3 cm x 1 cm) z 5-ego liścia licząc od stożka wzrostu nie zawierające nerwów.
- II. korzenie dł. ok. 1 cm, pobrane na wysokości 2-2,5 cm od stożka wzrostu;

Zebrane tkanki infiltrowano n-heksadekanem, który służył jako krioprezerwant.

Po zakończeniu infiltracji:

- I. z liści wycinano specjalnym próbnikiem okrągłe fragmenty o średnicy 1,2 mm i umieszczano w miedzianym „holderze” – 1 skrawek liścia na „holder”.
- II. fragmenty korzeni układano w „holderze” po 2-3 (w zależności od grubości). W każdym przypadku wolne przestrzenie wypełniano n-heksadekanem.

Tak przygotowane próbki zamrażano pod wysokim ciśnieniem (2000 barów) w urządzeniu Leica EMPACT (Leica, Vienna, Austria) w temperaturze ciekłego azotu. Próbki przechowywane były w naczyniu Dewara w temperaturze ciekłego azotu (-196°C).

b. Odwadnianie w niskiej temperaturze (freeze substitution)

Odwadnianie w niskiej temperaturze przeprowadzono w urządzeniu Leica EM AFS (Automatic Freeze-Substitution system). Procedura składała się z następujących czynności:

1. przeniesienie próbek z ciekłego azotu do acetonu (100%) o temp. -85°C na 96 godz.
2. ogrzewanie próbek w tempie 2°C na godzinę (27,5 godz.) do uzyskania temperatury -30°C , po czym inkubacja przez 22 godz.
3. dalsze ogrzewanie w tempie 2°C na godzinę do temperatury 4°C (17 godz.) po czym inkubacja przez kolejne 8 godz.
4. Ostatni etap ogrzewania w tempie 2°C na godzinę do 20°C (8 godz.).

c. Zatapianie materiału roślinnego w żywicy Spurr'a

Odwodnione próbki impregnowano w żywicy epoksydowej według przepisu Spurr'a (Spurr, 1969) wprowadzonej w gradiencie acetonu:

- Spurr-aceton 1:3 przez 1 dzień
- Spurr-aceton 1:1 przez 1 dzień
- Spurr-aceton 3:1 przez 8 godzin

Następnie próbki zatopiono w czystej żywicy epoksydowej Spurr'a (z 3 krotną zmianą żywicy w celu dokładnego wypłukania acetonu). Polimeryzację przeprowadzono w temperaturze 60°C przez noc.

Krojenie skrawków ultracienkich

Skrawki ultracienkie (100 nm) wykonano przy użyciu ultramikrotomu Leica Ultracut UCT. Skrawki umieszczano na aluminiowych siatkach (o 50 lub 200 oczkach).

Mikroanaliza rentgenowska (EDX) i mikroskopia elektronowa

Mikroanalizę przeprowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego JEM 1400 (JEOL Co., Japonia 2008) wyposażonego w detektor EDX (Energy-Dispersive X-ray) (EDS INCA Energy TEM, Oxford Instruments). Mikrofotografie wykonano z wykorzystaniem kamery CCD MORADA (SiS-Olympus). Skrawki analizowano przy napięciu na katodzie 120 kV. Limit detekcji wynosił 0.1-0.5 % w/v. Wszystkie parametry analizy (grubość skrawków, napięcie na katodzie, wielkość miejsca analizy) były takie same.

3.2.7.2. Lokalizacja Zn i Cd na poziomie komórkowym (apoplast/symplast) oraz w tkankach badanych roślin - metodami ICP MS w izolowanych protoplastach i płynie apoplastycznym oraz z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1

Analiza stężenia Zn

Badania mające na celu określenie stężenia Zn w symplacie i apoplaście pomiędzy 5-tygodnowymi roślinami z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* a typu dzikiego zostały przeprowadzono następującymi metodami:

- analiza różnic w poziomie akumulacji Zn w protoplastach izolowanych z korzeni z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1
- analiza stężenia Zn metodą ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy):
 - w protoplastach izolowanych z liści.
 - w płynie apoplastycznym izolowanym z liści metodą infiltracji i wirowania (Lohaus i inni, 2001)

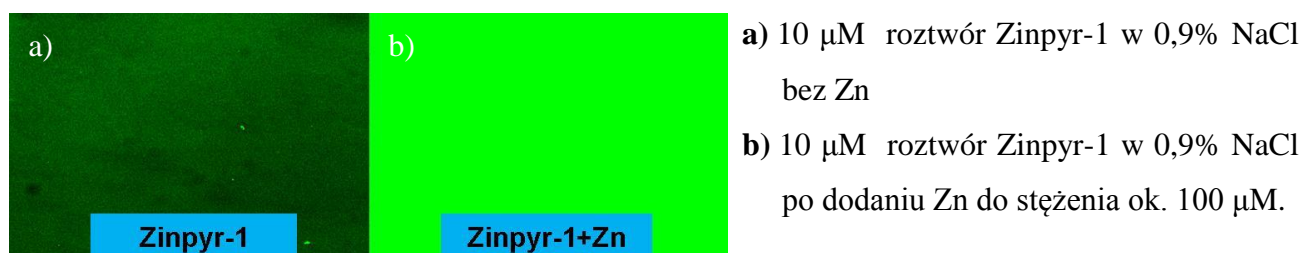
Analiza lokalizacji Zn

Badanie lokalizacji Zn w tkankach liści i korzeni roślin transformowanych genem *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* oraz roślin typu dzikiego wykonano z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 (Sigma).

3.2.7.2.1. Charakterystyka Zinpyr-1

W badaniach różnic w poziomie akumulacji Zn w protoplastach izolowanych z korzeni oraz lokalizacji Zn w korzeniach i liściach wykorzystano barwnik Zinpyr-1 (Sigma). Sinclair i inni (2007) zbadali i udokumentowali możliwość wykorzystania barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 do wyznaczania lokalizacji oraz określania relatywnych lub bezwzględnych (możliwe przy odpowiedniej kalibracji, nie stosowano w niniejszej pracy) ilości Zn znajdującego się w roślinach. Zinpyr-1 jest związkiem chemicznym, który bardzo łatwo przenika błony komórkowe. Charakteryzuje się dużym powinowactwem do Zn^{2+} ($K_d=0,7\pm0,1$ nM). Po utworzeniu kompleksów ze słabo związanymi bądź wolnymi jonami Zn^{2+} wykazuje fluorescencję z maksymalną emisją dla długości fali 540 nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali 488 nm (Mellitech Informacja o produkcie Zinpyr-1).

Poniżej wstępne testy sprawdzające działanie barwnika w warunkach obecności Zn i bez tego pierwiastka. Fluorescencja Zinpyr-1:



3.2.7.2.2. Materiał roślinny.

Określenie lokalizacji i stężenia Zn przy użyciu Zinpyr-1 (Sigma) wykonano dla roślin hodowanych zgodnie z schematami przedstawionymi na Fig. 5 a i b.

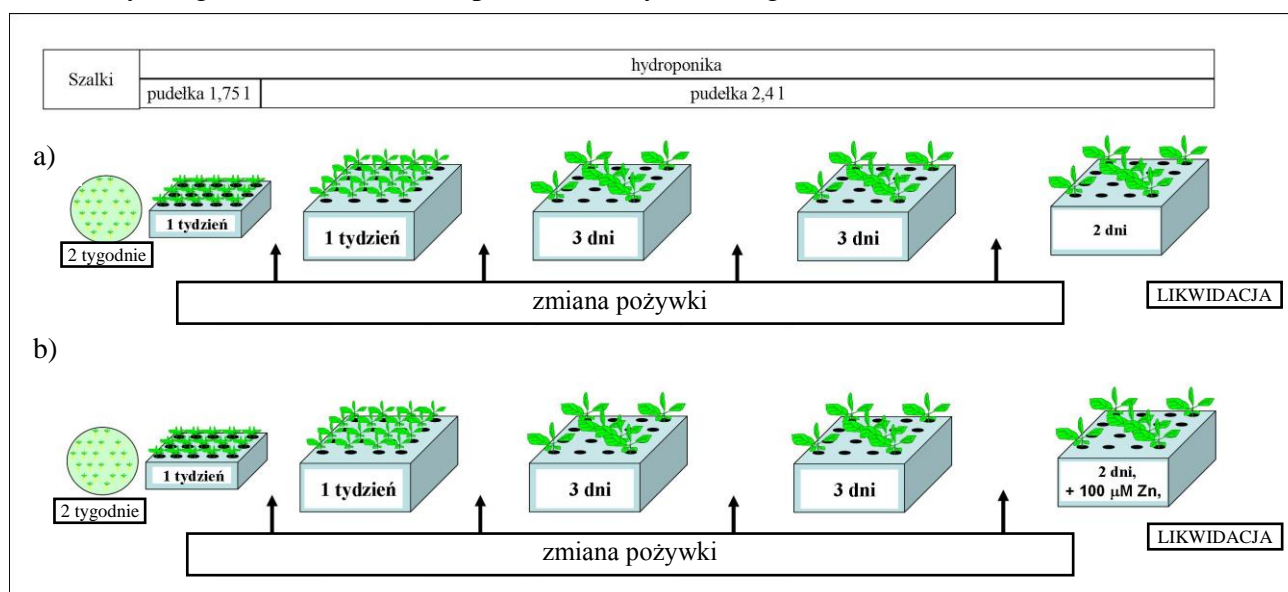


Fig. 5. Schematy hodowli roślin i ich ekspozycji na 0,5 μM Zn (a), i 100 (b) μM . Rośliny wysiewano na pożywkę $\frac{1}{4}$ Knop'a zestaloną agarem, siewki po ok. 2 tygodniach przenoszono do pudełek o pojemności 1,75 l, kolejno po tygodniu przenoszono siewki do pudełek 2,4 l a następnie po 2 zmianach pożywki co 3 dni rozpoczynano hodowlę kontrolną lub w obecności 100 μM Zn na 2 dni.

a) Poziom stężenia Zn w protoplastach korzeniowych – metoda z użyciem Zinpyr-1

Protoplasty izolowano z korzeni 6-tygodniowych roślin tytoniu transformowanych genem *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C* oraz typu dzikiego rosnących w warunkach kontrolnych (0,5 μM ZnCl_2), zgodnie z procedurą Siefritz i inni (2002) z niewielkimi zmianami.

- Całe korzenie (za wyjątkiem 2-3 cm od strefy przejściowej pomiędzy korzeniem a łodygą) zostały podzielone skalpelem na 2-3 mm skrawki i przeniesione na szalki Petriego zawierające 2 ml roztworu enzymów do trawienia ścian komórkowych (0.8% w/v cellulazy, 0.1% w/v pektolazy, 0.5% BSA - Bovine Serum Albumin), 0.5% polivinyłpirrolidone, 1 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 8 mM MES, sorbitol do 300 mosmol, pH 5.5 ustawione przy pomocy KOH).

- Inkubację na szalkach prowadzono na wytrząsarce (100 rpm) przez 4 godziny w 30°C, w ciemności.
- Następnie roztwór przepuszczono przez nylonową siatkę w celu oddzielenia większych nie strawionych kawałków korzeni od protoplastów.
- Otrzymany roztwór z frakcją protoplastów korzeniowych został zwirowany przez 10 min przy 200g w temperaturze pokojowej, supernatant odrzucono (w celu usunięcia enzymów z roztworu), a pozostające na dnie protoplasty zawieszono w roztworze RIS (Root Isotonic Solution: 1 mM CaCl₂, 10 mM KCl, sorbitol do 300 mosmol, pH 5.5 ustawione przy pomocy KOH).
- W kolejnym etapie próbki z protoplastami zwirowano ponownie w takich samych warunkach, a osad zawierający protoplasty korzeniowe zawieszono w roztworze RIS z dodatkiem 100 μM ZnCl₂ (100 μl, 1 mM roztworu ZnCl₂ zostało dodane do 1 ml RIS), po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min.
- Równolegle dla każdej linii badanych roślin, prowadzono inkubację protoplastów w warunkach kontrolnych bez dodatku Zn do roztworu RIS.
- Następnie protoplasty kontrolne i poddane działaniu Zn płukano dwukrotnie poprzez wirowanie (6 min przy 200 g w temperaturze pokojowej) przy czym za każdym razem supernatant był usuwany i zastępowany nową porcją 2 ml RIS.
- Zinpyr-1 dodano do zawiesiny protoplastów w RIS tak aby końcowe stężenie wynosiło 10 μM. Inkubację prowadzono przez 10 min na wytrząsarce przy 100 rpm w ciemności w temperaturze pokojowej.
- Po zakończeniu inkubacji w obecności Zinpyr-1, protoplasty trzymano na lodzie (ok. 4°C).
- Następnym etapem było wypłukanie protoplastów z nadmiaru barwnika Zinpyr-1 poprzez zwirowanie (6 min; 200g), zlanie supernatantu (roztwór zawierający Zinpyr-1) i ponowne zawieszenie w roztworze RIS (etapy te przeprowadzono w temp. 4°C).
- Kolejno, protoplasty przenoszono na szalki z cienkim denkiem i przeprowadzano w mikroskopie konfokalnym (ustawienia jak w pkt 3.2.7.2.2) analizę poziomu fluorescencji barwnika Zinpyr-1 z Zn.

Określenie względnych poziomów Zn w protoplastach z użyciem Zinpyr-1 (rozdział 3.2.7.2.1) powtórzono 3-krotnie z użyciem protoplastów korzeniowych pulowanych z korzeni z sześciu roślin z każdego traktowania na daną linię.

b) Poziom stężenia Zn w protoplastach liściowych – metoda z użyciem ICP-MS

Do analizy wykorzystywano 5 tygodniowe rośliny hodowane (a) w warunkach kontrolnych; (b) poddane ekspozycji: (b₁) przez 2 dni na 100 μM ZnCl₂, (b₂) przez 4 dni na 0,25 μM Cd. Izolację protoplastów przeprowadzono zgodnie z procedurą Wojas i inni (2009 r.).

- Do izolacji pobierano z 6-ciu roślin czwarty i piąty liść (licząc od góry), z których usuwano dolną epidermę (delikatnie ją ścierając używając drobnego papieru ściernego - p600) oraz wycinano główny nerw. Fragmenty liści (ułożone częścią bez epidermy do dołu) inkubowano 10 minut na szalkach Petriego z buforem MCP (ang. Mesophyll Cell Protoplast buffer) 2-krotnie rozcieńczonym wodą.

Skład buforu: 10 mM kwas 2-morfolino-etanosulfonowy – substancja buforowa, 0.5 M sorbitol – regulator osmotyczny, 1mM CaCl₂ - jony Ca²⁺ zwiększają stabilność błon i żywotność protoplastów, pH 5.6.

- Roztwór usuwano, a fragmenty liści inkubowano ponownie przez 10 minut w buforze MCP nie rozcieńczonym, co prowadzi do plazmolizy komórek.
- Następnie zastąpiono bufor MCP roztworem enzymów (0,5% celuloza, Sigma; 0,05% liza pektynowa, Sigma; 0,5% BSA w buforze MCP) i inkubowano 2 godziny w 30°C w celu strawienia ścian komórkowych.
- Po inkubacji dodano równą objętość buforu MCP i delikatnie wymieszano tak, aby następowało uwolnienie protoplastów ze strawionej tkanki. Roztwór enzymów zawierający protoplasty zebrano do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml.
- Kolejnym etapem było usunięcie tego roztworu, poprzez wirowanie i osadzenie protoplastów na warstwie Percollu. Roztwór Percollu (zawierającego 20 mM HEPES oraz, w celu uzyskania odpowiedniego ciśnienia osmotycznego, 0.5 M sorbitol, pH 7.2) nawarstwiono przy użyciu pipety Pasteur'a w objętości 5 ml na dno probówek.
- Probówki wirowano w rotorze wychylnym przy 200 g przez 5 minut w temp. 4°C.
- Na końcu usunięto supernatant a pozostałą w probówce frakcję zawierającą protoplasty, zlokalizowaną na granicy Percollu wymieszano.
- W celu dalszego oczyszczenia protoplastów metodą wirowania w gradiencie gęstości, wymieszano zebraną frakcję z odpowiednią objętością roztworu Percollu - tak aby końcowe jego stężenie wynosiło 50%. Następnie nawarstwiono kolejno 40% Percoll (pH 7.2, 0.5 M sorbitol, 20 mM HEPES, 0.5% BSA) i 0.5 M sorbitol (pH 7.2, 20 mM HEPES). Wirowano w rotorze wychylnym przy 200 g przez 5 minut.
- Zebrano frakcję zawierającą oczyszczone, nieuszkodzone protoplasty, zlokalizowane na granicy między 0.5 M sorbitolem i 40% Percollem.
- Ilość protoplastów określano przy użyciu komory Fuchs-Rosenthal (zliczanie komórek/protoplastów/obiektów w roztworach).

Oznaczenie stężenia Zn w wyizolowanych protoplastach (przechowywanych w -80°C) wykonywano w zmineralizowanych próbkach protoplastów przy użyciu metody spektrometrii mas

z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Do mineralizacji stosowano 100 µl próbki z zebranej frakcji protoplastów, 1,7 ml 69% HNO₃ oraz 200 µl H₂O₂. Próby mineralizowano w naczyniach teflonowych w mineralizatorze mikrofalowym (Microwave Labstation ETHOS, Milestone) zgodnie z zalecanym programem. Przed oznaczeniami próbki rozcieńczono ośmiokrotnie w wodzie dejonizowanej. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem kwadropolowego spektrometru mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej model Elan 9000 (Perkin Elmer Sciex, Kanada). Do oceny dokładności analizy stosowano certyfikowany materiał referencyjny (SWR-2 Trace Elements in Water, NIST, USA). Wyniki analizy stężenia cynku w materiale wzorcowym mieściły się w zalecanym zakresie zgodności. Wyniki stężenia Zn w próbce zawierającej protoplasty przeliczono na ich wcześniej określoną ilość (przy użyciu komory Fuchs-Rosenthal).

Określenie stężenia Zn w protoplastach wykonywano dla próbek izolowanych z 6-ciu roślin z każdej linii, przypadających na każde z 3-ch powtórzeń biologicznych.

3.2.7.2.4. Analiza stężenia Zn w apoplaście i symplaście zgodnie z metodą izolacji płynu apoplastowego z liści tytoniu wg Mühling i Läubli (2003) tzw. metoda „infiltracji i wirowania”.

Badania przeprowadzono na 5-tygodniowych roślinach hodowanych jak przedstawiono na schemacie Fig. 5:

- a) w warunkach kontrolnych
- b) hodowanych w obecności 100 µM ZnCl₂ przez 2 dni

oraz zgodnie ze schematem zamieszczonym na Fig. 4:

- a) na roślinach hodowanych w obecności 0,25 µM Cd przez 4 dni.

Izolacja płynu apoplastycznego

Do izolacji płynu apoplastowego pobierano z każdej z sześciu roślin czwarty i piąty liść od góry. Pojedynczy liść ważono (waga przed infiltracją), delikatnie zwijano w „trąbkę” i wkładano do strzykawki zawierającej ok. 18 ml wody dejonizowanej (Millipore). Następnie w strzykawce wytworzono delikatne podciśnienie wyciągając dyszę strzykawki, po czym ją zwalniano doprowadzając do wzrostu ciśnienia wewnątrz, co prowadziło do infiltracji liścia wodą. Czynność powtarzano 2-3 krotnie (aż przestrzenie międzykomórkowe wypełniły się wodą i liść zmienił barwę na ciemnozieloną). Pozostałą wodę usuwano ze strzykawki, osuszano powierzchnię liści bibułą i następnie liść ważono (waga po infiltracji) i jak najszybciej wkładano ponownie do pustej strzykawki „ogonkiem” do dołu. Strzykawkę umieszczano w próbówce typu Falcon, próbówkę

w wirówce i wirowano w 4°C przez 8 minut przy 1000 g, co prowadziło do wypłynięcia rozcieńczonego płynu apoplastycznego z liścia na dno próbówki Falcon.

Roztwór płynu apoplastowego (AWF z ang. Apoplastic Wash Fluid) zbierano z dna próbówki typu Falcon pipetą i mierzono jego objętość. Dodatkowo ważono liście po wirowaniu (waga po wirowaniu). Wagi liści przed wirowaniem były we wszystkich przypadkach wprost proporcjonalne do wagi liści po infiltracji, do ilości otrzymanego roztworu płynu apoplastowego oraz do wagi liści po wirowaniu. Takie wyniki wskazują na powtarzalność metody i zależność wielkości liści do ilości przestworów komórkowych w blaszce liściowej, a co za tym idzie proporcji pomiędzy wielkością liści, a ilością wyizolowanego płynu apoplastycznego.

Izolacja płynu symplastycznego

Do izolacji płynu symplastycznego z 5 tygodniowych roślin tytoniu hodowanych w warunkach kontrolnych oraz przez 4 dni w obecności 0,25 μM Cd wykorzystano rozszerzenie metody infiltracji i wirowania wg Mühling i Läubli (2003). Do tego celu użyto liści, które pozostają po ostatnim etapie izolacji płynu apoplastycznego, które następnie:

- gwałtownie zamrażano w ciekłym azocie w celu rozbicia tkanek,
- wirowano przez 8 minut przy 1000 g temperaturze pokojowej w strzykawkach włożonych do próbówek typu Falcon. Podczas tego etapu tkanki ulegają rozmrożeniu i ich zawartość (sok liściowy ang. leaf sap) zostaje na dnie próbówki typu Falcon. Wszystkie stałe fragmenty liścia (ściany komórkowe) pozostają w strzykawce.

W celu określenia stężenia Zn w płynie apoplastycznym i symplastycznym, najpierw otrzymane próbki poddano łagodnej mineralizacji poprzez ich zmieszanie w proporcji 1:1 z 69% HNO_3 oraz inkubację przez noc w temperaturze 4°C. Następnie wykonano pomiary stężenia Zn metodą ICP-MS zgodnie z procedurą z pkt. 3.2.6.2. Aby pomiary były możliwe należało wykonać rozcieńczenia roztworów izolatów, przy czym te dla apoplastu rozcieńczano w mniejszym stopniu niż te zawierające płyn symplastyczny.

Bardziej rozcieńczano także próbki pochodzące od roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn niż te pochodzące od roślin hodowanych w warunkach kontrolnych:

- dla płynu apoplastycznego:

- A. 10 krotnie dla próbek pobranych z roślin kontrolnych,
- B. 20 krotnie dla próbek pobranych z roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn,

- dla płynu symplastycznego:

- A. 100 krotnie dla próbek pobranych z roślin kontrolnych,
- B. 200 krotnie dla próbek pobranych z roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn.

3.2.7.2.5 Analiza lokalizacji Zn w korzeniach i liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1

Materiał do doświadczeń pobrano z 5-tygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 0,5 i 100 μM Zn hodowanych odpowiednio zgodnie z schematem przedstawionym na Fig. 5. Procedurę przygotowania korzeni i liści przedstawiono na Fig. 6 a i b. Preparaty analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu konfokalnego NIKON A1 z wykorzystaniem lasera argonowego przy długości fali 488 nm z użyciem filtra FITC - 500 – 550 nm (z ang. **F**luorescein **I**so**T**hio**C**yanate - izotiocyanian fluoresceiny) przy obiektywie z 10-krotnym powiększeniem. Analizy były wykonywane przy jednakowych ustawieniach mikroskopu (mocy lasera i czułość detektora) dla każdego z badanych wariantów. Dzięki temu w ramach analizy możliwe było relatywne porównanie ilości Zn pomiędzy roślinami transgenicznymi a typu dzikiego dla każdego z wariantów hodowli roślin (ale nie pomiędzy roślinami hodowanymi w obecności różnych stężeń Zn).

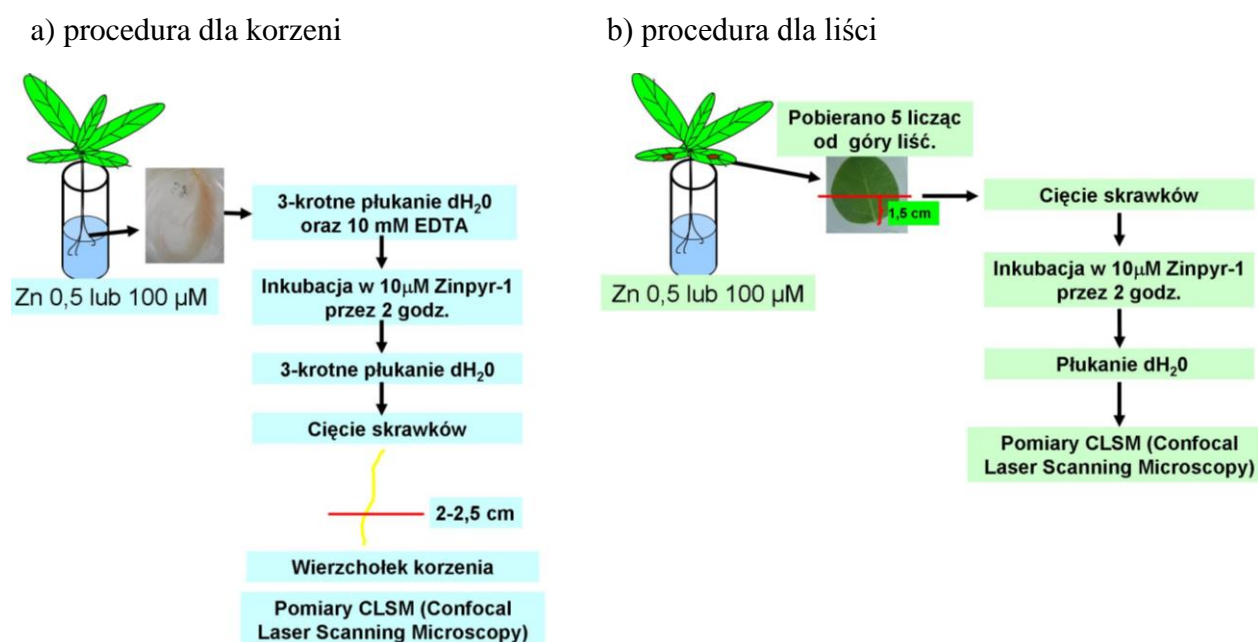


Fig. 6. Schematy przygotowywania próbek korzeni (a) i liści (b) w eksperymentach mających na celu określenie lokalizacji Zn z użyciem barwnika Zinpyr-1.

3.2.8. Analiza zmiany ekspresji genów w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* poddanemu ekspozycji na nietoksyczne stężenie Cd

3.2.8.1. Materiał roślinny

Rośliny 5-tygodniowe hodowano w obecności 0,25 μM Cd przez 4 dni według schematu przedstawionego na Fig. 4 a, (rozdział 3.2.6). Do analizy mikromacierzowej, wykonania RT-PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym używano homogennej próby korzeni pulowanej z 6 roślin.

Podczas zbierania materiału pobierano 2/3 długości korzeni licząc od wierzchołka wzrostu odrzucając ok. 2-3 cm odcinek. Pobrane korzenie osuszano i zamrażano w ciekłym azocie (-196°C), a następnie bez rozdrabniania przechowywano w zamrażarce w temp. -80°C.

3.2.8.2. Izolacja RNA

Zamrożone korzenie homogenizowano w moździerzu w ciekłym azocie. RNA izolowano używając zestawu do izolacji RNA firmy Qiagen (RNase plant mini kit) (opis w pkt. 3.2.4.1) po czym wykonano trawienie pozostałości DNA w próbce (opis w pkt. 3.2.4.2.). Ilość RNA sprawdzono używając spektrofotometru Nanodrop ND100 (Nanodrop, Wilimington, USA) natomiast jakość i integralność RNA sprawdzono wykorzystując urządzenie Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, USA)

3.2.8.3. Analiza transkryptomu za pomocą mikromacierzy

Do badań wykorzystano mikromacierze Affymetrix A-AFFY-135ATCTOBa520488 (w skrócie: A-AFFY-135), zawierające sondy dla 44-ch tysięcy sekwencji (unigenów) tytoniowych (Edwards i inni 2010). Amplifikacja i znakowanie RNA przeprowadzono z użyciem zestawu Affymetrix 3' IVT-Express zgodnie z standardową procedurą producenta (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK). Znakowanie RNA i hybrydyzacje do mikromacierzy przeprowadzono na zlecenie w Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Craigon i inni, 2004).

Wszystkie analizy wyników badań mikromacierzowych były wykonywane we własnym zakresie. Otrzymane wyniki zostały znormalizowane używając protokołu RMA (**R**obust **M**ulti-array **A**verage) w programie DChip (Li i Wong, 2001). Analizę wyników mikromacierzowych przeprowadzono z użyciem programu DChip (Li i Wong, 2003 i Li, 2008) zgodnie z kryteriami: różnica w ekspresji (ang. fold change, skrót: fc) wyznaczono na poziomie 1,3, wartość e (e value) na poziomie 0.05, ilość permutacji: 200.

3.2.8.4. Analiza wyników mikromacierzy pod względem przynależności do grupy funkcjonalnej Gene Ontology (GO)

Mikromoacierze A-AFFY-135 zawierają sondy dla ok. 44 tysięcy sekwencji tytoniowych, ich charakterystyka (annotacja z ang. annotation) została przeprowadzona przez Edwardsa i inni (2010) przy użyciu programu BLASTX metodą "najlepszego trafienia" (ang. "Best Hit") dla homologicznych sekwencji białkowych z *Arabidopsis thaliana*. Sekwencje dla *A. thaliana* pochodziły z bazy TAIR (The Arabidopsis Information Resource) a ich najlepsze dopasowania do sekwencji tytoniowej było szukane przy założeniu, że wartość e (e value) będzie niższa niż 1×10^{-10} . Wyniki uzupełniono o dodatkowe dane przy użyciu programu BLAST2GO do przeszukania bazy

danych z białkami potrzebnymi dla organizmów (non-redundant proteins) GENE BANK. Wykorzystanie homologicznych sekwencji do *Arabidopsis thaliana* jest uzasadnione dużo większą dostępnością anotacji dla genów pochodzących z tej rośliny oraz tym, że dostępna jest dużo większa liczba darmowych narzędzi bioinformatycznych. W niniejszej pracy doktorskiej także do analizy funkcjonalnej Gene Ontology (GO), w stosunku do wyników właściwych dla *N. tabacum* wykorzystano najbliższą homologiczną sekwencję pochodzącą z *A. thaliana* (Edwards i inni, 2010).

Otrzymane wyniki badań z użyciem mikromacierzy analizowano pod względem przynależności do grupy funkcyjnej z użyciem narzędzi dostępnych TAIR w bazie Gene Ontology: „GO annotation search, functional categorization Gene Ontology at TAIR” oraz programu AmiGO - GO Term Enrichment (przy założeniu wartości p (p value) $<0,05$).

3.2.8.5. Potwierdzenie wyników analizy mikromacierzy poprzez badanie ekspresji wybranych genów

Na podstawie analizy mikromacierzowej, funkcjonalnej GO oraz nadreprezentacji kategorii GO, a także w oparciu o dostępną literaturę wybrano geny, których zmiana ekspresji mogła być przyczyną obniżenia pobierania Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*. Mikromacierz Affy-135 nie zawiera wszystkich znanych sekwencji genów tytoniowych kodujących białka, które mogą brać udział w pobieraniu Cd, dlatego do dalszych badań wybrano dodatkowe sekwencje znanych z literatury genów homeostazy metali (pomimo, że nie było ich wśród sond odpowiadających sekwencjom tych genów).

Dla wybranych genów szukano dostępnych opisów/charakterystyk sekwencji tytoniowych, używając programu BLASTX z ograniczeniem wyszukiwania tylko dla gatunku *N. tabacum* przy takich samych kryteriach jak użyte przez Edwardsa i inni (2010) (opisane powyżej) dla *A. thaliana*.

Aby zweryfikować otrzymane wyniki analizy z wykorzystaniem mikromacierzy zastosowano dwie metody do określenia poziomu transkryptów wybranych genów:

- metodę półilościową RT-PCR
- metodę ilościową Real Time PCR

Materiał roślinny do badań został pobrany z dwóch nowych niezależnych doświadczeń wykonanych w układzie doświadczalnym według schematu z Fig. 4a (rośliny hodowano w obecności $0,25 \mu\text{M}$ Cd przez 4 dni, rozdział 3.2.6). Izolacja RNA, trawienie DNA w otrzymanych próbkach RNA oraz Reakcja RT-PCR zostały przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w punktach od 3.2.4.1-3.2.4.4.

Półilościowa analiza metodą RT-PCR

Do reakcji PCR użyto następujących starterów:

CAX3 (EB428626) brak opisu dla homologicznego białka/sekwencji nukleotydów w tytoniu)

Homologiczne do: AtCAX3.

Starter lewy: 5' GCAATTCTTGCTCTGACGCA 3'

Starter prawy: 5' AGGTACCCGAGGTAGGCAAT 3'

Wielkość produktu: 320 pz.

NtOMT I (EB444811)

Starter lewy: 5' CCTGCTTATCCCGGTGTTGA 3'

Starter prawy: 5' GAAACCAGCAAATCCAGCCT 3'

Wielkość produktu: 397 pz.

NtHCT (DW003425)

Starter lewy: 5' ACCGCTTCACTATGCAACAAA 3'

Starter prawy: 5' AGGTAGGCAAGTTGTCATGGT 3'

Wielkość produktu: 332 pz.

NtVcaB42 (EB426333)

Starter lewy: 5' CTCAGGACTTGGTGTGGACG 3'

Starter prawy: 5' AAGCGAGCATCTCTTTCCCA 3'

Wielkość produktu: 228 pz.

NtMTPIa (AB201240)

Starter lewy: 5' ATGTGACGGTGAAGGTGTGC 3'

Starter prawy: 5' TCCATCTCACAGAGCCCCTT 3'

Wielkość produktu: 303 pz.

NtZIP1 (AB505626)

Starter lewy: 5' AAGACTCGTGCAGTGGCAAT 3'

Starter prawy: 5' CATGAGTCCAGCACCGAGAA 3'

Wielkość produktu: 273 pz.

NtIRT1 (AB263746)

Starter lewy: 5' GTTGTCGTCCAGTTGCTTGA 3'

Starter prawy: 5' AGAATGCAACCACCAAGTCC 3'

Wielkość produktu: 438 pz.

NtNASI (AB097697)

Starter lewy: 5' TTGTGGTGAAGCTGAAGGTC 3'

Starter prawy: 5' GCCCCTGGAGCCATATACTT 3'

Wielkość produktu: 471 pz.

Ilościowa analiza Real Time PCR

Analizę poziomu transkryptu metodą Real Time PCR wykonano używając 100-krotnego rozcieńczenia matrycy cDNA użytej w półilościowej analizie poziomu transkryptu RT-PCR.

Do reakcji Real Time PCR użyto zestawu: master mix SYBR® Green (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta.

Stosowano startery o następujących sekwencjach:

CAX3 (EB428626) brak opisu dla homologicznego białka/sekwencji nukleotydów w tytoniu)

Homologiczne do: AtCAX3

Starter lewy: 5' GCAATTCTTGCTCTGACGCA 3'

Starter prawy: 5' AGGTACCCGAGGTAGGCAAT 3'

Wielkość produktu: 320 pz.

NtOMET1a (EB444811)

Starter lewy: 5' TGTGAGGTGCACTTGGTT 3'

Starter prawy: 5' CCGGATAAGCAGGAGCAAT 3'

Wielkość produktu: 114 pz.

NtHCT (DW003425)

Starter lewy: 5' TCTCATCCCAACAGCAGACA 3'

Starter prawy: 5' CAAAAGGGCAACCAGTTCCA 3'

Wielkość produktu: 113 pz.

NtVcaB42 (EB426333)

Starter lewy: 5' CATGGGAAAGAGATGCTCGC 3'

Starter prawy: 5' AGGCTCTTCTTGACCCAAA 3'

Wielkość produktu: 123 pz.

NtMTP1a (AB201240)

Starter lewy: 5' GAACACGGCCATAATCATGAAG 3'

Starter prawy: 5' ATGGTGATGGTGTCTGGCTAAC 3'

Wielkość produktu: 111 pz.

NtZIP1 (AB505626)

Starter lewy: 5' TGGTGGCTCAGTCTGGAGAT 3'

Starter prawy: 5' CGAAGGAGCTCAGAACTGGAA 3'

Wielkość produktu: 94 pz.

NtIRT1 (AB263746)

Starter lewy: 5' ACTTACGAGGAGAACAGCCC 3'

Starter prawy: 5' TCAGAAGGCCAGCAGATGAC 3'

Wielkość produktu: 73 pz.

NtNAS1 (AB097697)

Starter lewy: 5' TTGCTTGAGTTCAACATCCTTAC 3'

Starter prawy: 5' AGGGCCTGATCCAATAAATGCT 3'

Wielkość produktu: 75 pz.

NtPRX clone:tpoxC1 (AB027752)

Starter lewy: 5' AGGAGAGAAAAGGGCTGCAC 3'

Starter prawy: 5' AGAAACAACACCAGGGCACA 3'

Wielkość produktu: 103 pz.

Jako gen referencyjny użyto *NtEF1a* („*elongation factor 1a*”). Do wykrycia poziomu ekspresji *NtEF1a* stosowano startery:

NtEF1a

Starter lewy: 5' GCTCCCACTTCAGGATGTGTA 3'

Starter prawy: 5' ACACGACCAACAGGGACAGT 3'

Wielkość produktu: 6 pz.

Reakcję Real Time PCR prowadzono w urządzeniu Real-Time IQ 5 (Bio-Rad, Hercules, CA) thermocycler. Startery były projektowane przy pomocy programu BLAST-Primer i PRIMER tak, aby temperatura annilingu była najbardziej zbliżona do 53°C, dzięki czemu możliwe było użycie jednego programu do analizy wszystkich genów i genów referencyjnych. Jedna sekwencja analityczna (1 program) Real Time PCR pozwalała wykonać analizę wszystkich genów z wydajności działania starterów – powyżej 90%:

Reakcja przebiegała według sekwencji następujących etapów:

Cykl 1: 1x

krok 1: 95,0 °C przez 03:00.

Cykl 2: 60x

krok 1: 95,0 °C przez 00:10.

krok 2: 53,0 °C przez 00:50 zapis poziomu fluorescencji – wynik reakcji PCR .

Cykl 3: 26x

krok 1: 70,0 °C-95,0 °C przez 00:30 Analiza krzywej topnienia

Dla każdej pary starterów wykonano analizę wydajności ich działania w zakresie rozcieńczenia matrycy od 100 do 10000 razy. Wydajność starterów nie spadła poniżej 90%

3.2.9. Analiza poziomu lignifikacji, akumulacji H₂O₂ oraz aktywności peroksydaz w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* poddanemu ekspozycji na Cd

3.2.9.1. Materiał rośliny

Opisane poniżej analizy przeprowadzono na 5-tygodniowych roślinach hodowanych według schematu z Fig. 4 a, poddanych ekspozycji na 0,25 µM Cd przez 4 dni (opis w rozdziale 3.2.6).

3.2.9.2. Badanie poziomu lignifikacji ścian komórkowych w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na 0,25 µM Cd przez 4 dni.

Analiza autofluorescencji lignin

Korzenie pobrane z co najmniej trzech roślin zatapiano w 1,8 % Agarze (maksymalnie schłodzonym). Po zastygnięciu wykonywano przekroje poprzeczne zaczynając na wysokości 2 cm nad stożkiem wzrostu. Wykonywano skrawki o grubości ok. 0,5 mm po czym układano je tak na szkiełku podstawowym aby zachowana została ich kolejność. Następnie oglądano preparaty w mikroskopie konfokalnym NIKON A1 z wzbudzeniem laserem Ti:Sapphire (femtosekundowy, podczerwony laser multifotonowy; COHERENT Inc. Model Chameleon Ultra II) o długości fali

700 nm (efektywnie długość fali odpowiada 350 nm w układzie monofotonowym), impulsy o szer. 140 fs z częstotliwością 80 MHz; moc średnia >3,5 W, max. emisji przy długości fali 400-440 nm (kanał niebieski).

Analiza poziomu lignifikacji przy użyciu safraniny

Analizę wykonano zgodnie z procedurą:

1. Skrawki zatopiono w agarze i barwiono na szkiełku podstawowym w 0,5 % (w/v) O-safraninie rozpuszczonej w 50 % EtOH.
2. Inkubację prowadzono przez 2 min. w temp. pokojowej, po czym wypłukano pozostałości barwnika 50% roztworem etanolu (Lux i inni, 2005).
3. Następnie skrawki analizowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego NIKON A1 z użyciem lasera Ti:Sapphire przy długości fali 700 nm (efektywnie długość fali odpowiada 350 nm w układzie monofotonowym) impulsy o szer. 140 fs z częstotliwością 80 MHz; moc średnia >3,5 W, wykrywano emisję długości fali 640 - 700 nm (kanał czerwony).

3.2.9.3. Badania akumulacji nadtlenu wodoru

Poziom H_2O_2 zbadano metodą Thordal-Christensen'a i inni (1997). Korzenie poddano działaniu roztworu 3,3'-diaminobenzzydiny (DAB, stężenie: 1 mg/ml), która tworzy brunatne kompleksy w miejscach powstawania H_2O_2 .

Badanie wykonano zgodnie z procedurą:

- 1) Całe korzenie zanurzano w 150 ml zlewkach wypełnionych 100 ml 5 mM wodnego roztworu DAB (pH=3,8), i wstawiano do komory próżniowej wytwarzając niewielkie podciśnienie (ok. -0,04 MPa) (Ghasemi i inni 2009) w celu zwiększanie stopnia infiltracji roztworu.
- 2) Po upływie 15 min. bardzo powoli wyrównywano ciśnienie i prowadzono inkubację w tym samym roztworze przez 8 godzin w temp. pokojowej w ciemności.
- 3) Następnie korzenie zatapiano w agarze i wykonywano skrawki zachowując kolejność od stożka wzrostu (zaczynano 2 cm nad stożkiem wzrostu).
- 4) Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym (Zeiss) oceniając stopień brunatnego zabarwienia w tkankach korzeni, świadczącego o stopniu akumulacji nadtlenu wodoru. Wykonywano jednocześnie dokumentację fotograficzną.

3.2.9.4. Badania aktywności peroksydaz

Do analizy aktywności peroksydaz (wszystkich oraz tylko jonowo związanych ze ścianą komórkową) pobierano od 200 do 400 mg korzeni z wysokości od 2 do 5 cm licząc począwszy od

stożka wzrostu. Procedura przygotowania materiału do analizy aktywności enzymatycznej peroksydaz wykonywano zgodnie z procedurą Xue i inni (2008) z drobnymi zmianami.

Procedura doświadczalna:

1. Próbki korzeni zamrażano w ciekłym azocie i rozdrabniano w porcelanowym moździerzu w 1 ml 10 mM buforu fosforanowego (pH 6).
2. Następnie otrzymany proszek wraz z buforem fosforanowym wirowano 10 min. przy obrotach 5000 g w temp. 4°C.
3. Zebrany supernatant stanowił próbkę w której można zbadać całkowitą aktywność **wszystkich peroksydaz komórkowych (TOTALPRX)**

W celu uzyskania preparatu zawierającego jedynie białka związane jonowo ze ścianą komórkową:

1. Pellet zawieszono ponownie w 1 ml, 10 mM buforu fosforanowego (pH 6) i wirowano przez 5 min przy 5000g i odrzucając supernatant
2. Punkt 1 powtórzono 3 krotnie
3. Kolejno po ostatnim wirowaniu w otrzymanym supernatancie zmierzono aktywność peroksydaz. Ponieważ nie było żadnej mierzalnej aktywność peroksydaz, co świadczy o wypłukaniu wszystkich peroksydaz niezwiązanych ze ścianą komórkową, otrzymany osad zawieszono w 1 ml, zawierającym 10 mM buforu fosforanowego (pH 6) z dodatkiem 1M NaCl i inkubowano 5 godz. w celu uwolnienia białek związanych ze ścianą komórkową wiązaniami jonowymi.
4. Na koniec próbki ponownie zwirowano przez 10 min. przy 5000 g a otrzymany supernatant stanowił próbę **zawierającą białka, w tym peroksydazy związane jonowo ze ścianą komórkową (CWPRX).**

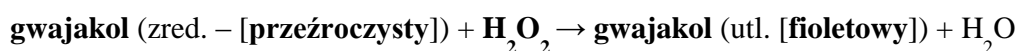
We wszystkich otrzymanych próbkach oznaczono stężenie białka wg metody Bradforda, stosując według zaleceń producenta komercyjnie dostępny odczynnik (Sigma, B6916). Analiza ta dzięki reakcji barwnej błękitu kumasyny z białkami pozwala określić na podstawie krzywej wzorcowej ich stężenie w roztworze. Absorbancję prób mierzono przy długości fali 595 nm przy użyciu urządzenia Biophotometer (Eppendorf). Krzywą wzorcową sporządzono dla roztworu BSA, w zakresie polecanym przez producenta stosowanego urządzenia pomiarowego: 100-1500 µg/ml.

Aktywność peroksydaz badano spektrofotometrycznie w 10 mM buforze fosforanowym pH 7,0 wg metody Cordoba-Pedregosa i inni (1996) z drobnymi zmianami. Objętość ekstraktu białkowego, której użyto w doświadczeniach ustalono doświadczalnie na podstawie krzywych wydajności reakcji, gdzie dodawano reprezentatywną próbkę w ilości: TOTALPRX = 1, 2, 4, 8 i 16 µl oraz CWPRX = 5, 10, 20, 40 i 80 µl.

Analizę aktywności peroksydaz przeprowadzono w objętości 1 ml gdzie dodano:

- 10 μ l TOTALPRX (próbki ekstraktu z całkowitą aktywnością peroksydaz) do 982,3 μ l roztworu 10 μ M gwajakolu z 10 mM bufor fosforanowy o pH=7 a reakcje zaczynano dodając 7,7 μ l H₂O₂
- 20 μ l CWPRX (próbki ekstraktu z aktywnością peroksydaz jonowo związanych ze ścianą komórkową) do 972,3 μ l roztworu 10 μ M gwajakolu z 10 mM bufor fosforanowy o pH=7 a reakcje zaczynano dodając 7,7 μ l H₂O₂.

Pomiaru dokonywano w czasie 2 minut, w temperaturze pokojowej. W tym okresie, przy długości fali 470 nm, mierzony jest wzrost absorbancji wynikający ze spadku stężenia zredukowanego gwajakolu. Utlenianie gwajakolu pod wpływem działania peroksydaz w obecności nadtlenu wodoru przebiega zgodnie z reakcją:



Aktywność enzymatyczną wyrażono jako: zmianę absorbancji (Δ abs) * min⁻¹ * ng⁻¹ białka (Donnini i inni, 2011).

4. Wyniki

4.1. Analiza poziomu ekspresji transgenów (*AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T*) w tytoniu

W ramach pracy doktorskiej, z pokolenia T₁ (selekcja 3, 1, 1) wyprowadzono homozygotyczne linie pokolenia T₂ (wszystkie siewki odporne na kanamycynę) poprzez samozapylenie. Następnie, stosując metodę RT-PCR z użyciem specyficznych starterów (dla każdego z transgenów), zbadano poziom ekspresji wprowadzonych genów kodujących *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T* w czterech niezależnych liniach homozygotycznych dla każdego konstruktu. Otrzymane wyniki pokazują, że w pokoleniu T₂, u roślin transformowanych zachodzi ekspresja badanych transgenów. Jako kontrolę równej ilości RNA użytej w każdej reakcji, wykorzystano produkt amplifikacji cDNA genu *Tac9* z *Nicotiana tabacum*, kodującego aktynę. Wyniki reakcji przedstawiono na Fig 7.

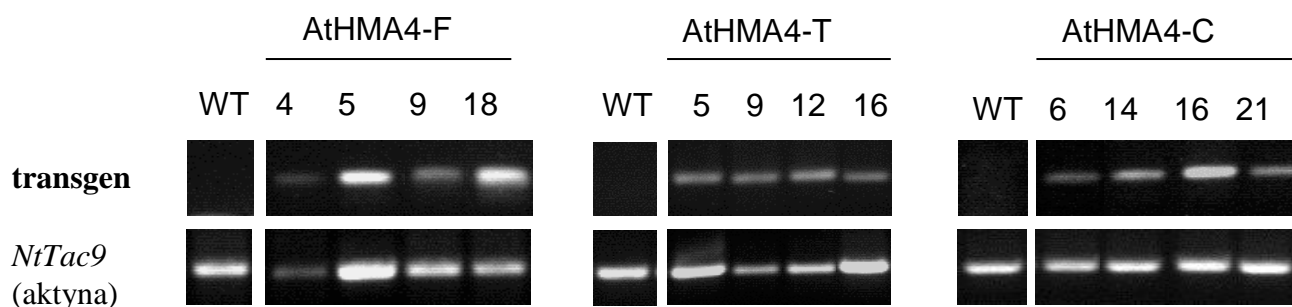


Fig. 7. Analiza ekspresji transgenów u roślin typu dzikiego (WT) oraz u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linie nr 4, 5, 9, 18, *AtHMA4-T* linie nr 5, 9, 12, 16, *AtHMA4-C* linie nr 6, 14, 16, 21. Jako punkt odniesienia zbadano ekspresję genu referencyjnego *NtTac9* kodującego aktynę.

Analiza poziomu ekspresji metodą RT-PCR wykazała, iż porównując wahania w poziomie transkryptu genu referencyjnego z wahaniami poziomu transkryptów kodujących transgeny, różnice pomiędzy liniami roślin transgeniczných pod względem obecności transkryptu są niewielkie (Fig. 7).

4.2. Określenie lokalizacji *AtHMA4-F-GFP* oraz *AtHMA4-C-GFP* w komórkach tytoniu

Białko HMA4 w *Arabidopsis thaliana* zlokalizowane jest w błonie komórkowej (Verret i inni, 2004). Przeprowadzenie transformacji tytoniu genem *AtHMA4-F* nie gwarantuje, że lokalizacja subkomórkowa białka będzie taka sama jak w roślinie, z której gen pochodzi. Z kolei *AtHMA4-C* koduje jedynie koniec C białka *AtHMA4* i nie wiadomo, w którym kompartmentcie w komórce transformowanego tytoniu będzie on zlokalizowany. Aby określić miejsce gdzie w komórce występują białka kodowane przez wprowadzone transgeny, przeprowadzono analizę

lokalizacji białek fuzyjnych AtHMA4-F-GFP i AtHMA4-C-GFP metodą przejściowej ekspresji w epidermie liści tytoniu. Znajomość lokalizacji komórkowej jest niezbędna dla interpretacji wyników prowadzonych badań, gdyż funkcja jaką pełni wprowadzone białko będzie ściśle zależała od jego lokalizacji.

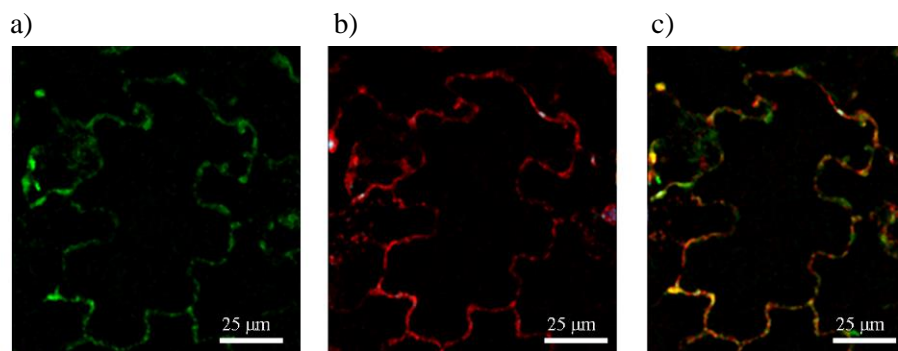


Fig. 8. Lokalizacja subkomórkowa *AtHMA4-F-GFP* w błonie komórkowej epidermy liści tytoniu. a) kolor zielony – *AtHMA4-F-GFP* b) kolor czerwony – jodek propidyny, c) nałożenie obrazów a) i b)

Wyniki wskazują na obecność AtHMA4-F-GFP w peryferycznych częściach komórki i kolokalizację ze strukturą zabarwioną jodkiem propidyny (Fig. 8). Jodek propidyny nie wnika do żywych komórek i wskazuje położenie apoplastu (zatem granicę pomiędzy apoplastem a symplastem). Mikroskopia konfokalna jest odmianą mikroskopii świetlnej, o zdolności rozdzielczej nie przekraczającej 0,27 µm. W związku z powyższym można wywnioskować, że pokrywanie się fluorescencji pochodzącej od AtHMA4-F-GFP i jodku propidyny w tym samym miejscu w komórkach wskazuje na lokalizację białka AtHMA4-F w błonie komórkowej (Fig. 8) tytoniu podobnie jak w *A. thaliana* (Verret i inni, 2004).

Analiza przejściowej ekspresji *AtHMA4-C:GFP* w tytoniu wskazuje na lokalizację białka w obrębie cytoplazmy gdzie stwierdza się obecność fluorescencji pochodzącej od białka fuzyjnego AtHMA4-C:GFP (Fig. 9). Białko AtHMA4-C nie posiada domen kotwiczących w błonach komórkowych, w związku z czym spodziewano się jego lokalizacji komórkowej w cytoplazmie.

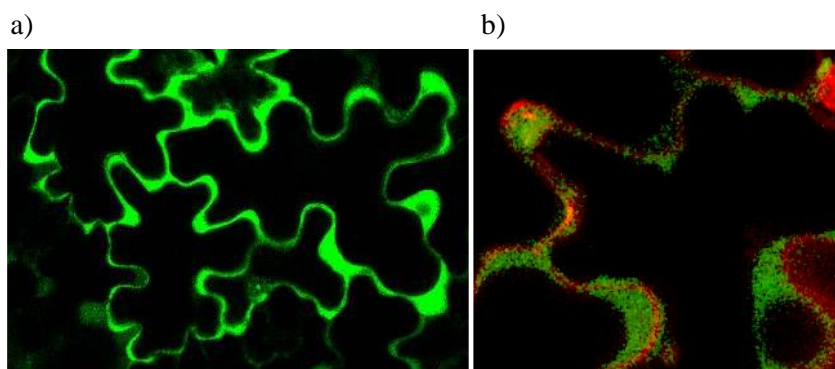


Fig. 9. Lokalizacja subkomórkowa *AtHMA4-C:GFP* w cytoplazmie komórek epidermy liści tytoniu. a) kolor zielony – *AtHMA4-C:GFP* b) kolor czerwony – jodek propidyny, nałożenie obrazu a)

4.3. Analiza poziomu akumulacji i tolerancji na cynk i kadm tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C* i *AtHMA4-T* – testy hydroponiczne

4.3.1. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd

Celem przeprowadzonych doświadczeń było określenie, czy ekspresja *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* oraz *AtHMA4-C* w tytoniu prowadzi do zmiany akumulacji i tolerancji na Zn i Cd w korzeniach i pędach. Badano stężenie obu metali w roślinach typu dzikiego i u transformantów poddanych ekspozycji na:

Zn: 0,5; 10; 50; 100 oraz 200 μM

Cd: 0,25 oraz 5 μM

We wszystkich wariantach eksperymentów biomasa roślin transgenicznych nie różniła się istotnie od biomasy roślin typu dzikiego (tabela 1). Wyjątek stanowi linia nr 21 roślin z ekspresją *AtHMA4-C*, u której biomasa roślin poddanych działaniu 5 μM Cd przez 6 dni była istotnie mniejsza niż u roślin typu dzikiego.

Tabela 1. Biomasa roślin transgeniczných (najniższy i najwyższy wynik pomiaru wraz z odchyleniem standardowym, n=6 w czarnej ramce) i typu dzikiego (wraz z odchyleniem standardowym, n=6 w czerwonej ramce). Na szaro wyróżniono wynik, który był różny u roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego. S.M. - Sucha Masa

Stężenie Zn/Cd	Wprowadzony gen	Najniższa średnia S.M. roślin transgeniczných [g]	Odchylenie standardowe dla najniższej średniej S.M. roślin transgeniczných [g]	Najwyższa średnia S.M. roślin transgeniczných [g]	Odchylenie standardowe dla najwyższej średniej S.M. roślin transgeniczných [g]	Średnia S.M. roślin typu dzikiego [g]	Odchylenie standardowe dla średniej S.M. roślin typu dzikiego [g]
Pęd							
0,5 μM Zn	AtHMA4-F	0,066	0,015	0,097	0,044	0,073	0,028
	AtHMA4-T	0,108	0,030	0,058	0,023	0,107	0,046
	AtHMA4-C	0,081	0,016	0,090	0,040	0,081	0,029
10 μM Zn	AtHMA4-F	0,071	0,013	0,113	0,049	0,132	0,055
	AtHMA4-T	0,095	0,011	0,129	0,046	0,129	0,041
	AtHMA4-C	0,077	0,032	0,099	0,027	0,085	0,019
50 μM Zn	AtHMA4-F	0,095	0,046	0,162	0,040	0,123	0,057
	AtHMA4-T	0,131	0,026	0,111	0,031	0,130	0,018
	AtHMA4-C	0,094	0,037	0,116	0,028	0,135	0,032
100 μM Zn	AtHMA4-F	0,106	0,038	0,157	0,069	0,121	0,046
	AtHMA4-T	0,117	0,036	0,125	0,036	0,144	0,056
	AtHMA4-C	0,108	0,033	0,128	0,026	0,149	0,029
200 μM Zn	AtHMA4-F	0,089	0,022	0,141	0,051	0,133	0,056
	AtHMA4-T	0,087	0,029	0,135	0,048	0,134	0,060
	AtHMA4-C	0,094	0,019	0,104	0,046	0,112	0,026
0,25 μM Cd	AtHMA4-F	0,056	0,017	0,098	0,034	0,060	0,007
	AtHMA4-T	0,076	0,013	0,099	0,026	0,078	0,009
	AtHMA4-C	0,120	0,040	0,160	0,010	0,190	0,050
5 μM Cd	AtHMA4-F	0,061	0,019	0,096	0,031	0,059	0,027
	AtHMA4-T	0,123	0,054	0,161	0,062	0,168	0,057
	AtHMA4-C	0,110	0,038	0,158	0,017	0,158	0,013
Korzeń							
0,5 μM Zn	AtHMA4-F	0,013	0,002	0,022	0,010	0,016	0,006
	AtHMA4-T	0,014	0,005	0,024	0,008	0,023	0,015
	AtHMA4-C	0,020	0,006	0,024	0,005	0,019	0,005
10 μM Zn	AtHMA4-F	0,012	0,003	0,023	0,014	0,031	0,015
	AtHMA4-T	0,019	0,009	0,028	0,011	0,031	0,016
	AtHMA4-C	0,018	0,007	0,026	0,008	0,023	0,004
50 μM Zn	AtHMA4-F	0,015	0,006	0,025	0,014	0,032	0,012
	AtHMA4-C	0,018	0,005	0,020	0,010	0,030	0,009
100 μM Zn	AtHMA4-F	0,013	0,005	0,022	0,009	0,023	0,010
	AtHMA4-T	0,013	0,004	0,016	0,005	0,025	0,012
	AtHMA4-C	0,012	0,004	0,014	0,003	0,018	0,006
200 μM Zn	AtHMA4-F	0,012	0,003	0,021	0,010	0,020	0,007
	AtHMA4-T	0,010	0,004	0,019	0,008	0,020	0,008
	AtHMA4-C	0,010	0,005	0,015	0,006	0,014	0,003
0,25 μM Cd	AtHMA4-F	0,012	0,004	0,023	0,009	0,012	0,004
	AtHMA4-T	0,019	0,002	0,026	0,009	0,017	0,004
	AtHMA4-C	0,033	0,011	0,040	0,003	0,046	0,010
5 μM Cd	AtHMA4-F	0,013	0,004	0,024	0,009	0,013	0,006
	AtHMA4-T	0,027	0,012	0,042	0,028	0,036	0,016
	AtHMA4-C	0,021* - linia nr.21 (kolejna najniższa = 0,023)	0,006* - linia nr.21 (kolejna najniższa = 0,009)	0,034	0,012	0,040	0,010

4.3.1.1. Stężenie Zn i Cd u tytoniu z ekspresją AtHMA4-F

Aby sprawdzić, w jaki sposób ekspresja *AtHMA4-F* wpływa na akumulację Zn w tytoniu, rośliny hodowano na pożywce $\frac{1}{4}$ Knop'a zawierającej Zn w stężeniu od 0,5 μM (pożywka kontrolna) do 200 μM . Dla większości linii roślin transformowanych hodowanych w obecności 0,5 μM Zn nie zanotowano zmian w stężeniu Zn w korzeniach i pędzie w stosunku do typu dzikiego (Fig. 10 a-b). Przy 10 μM Zn w pożywce nie było różnicy w stężeniu Zn w korzeniach pomiędzy roślinami transformowanymi a typu dzikiego. Z kolei stężenie Zn w pędach roślin transformowanych było większe (Fig. 10 c-d), a ponieważ nie zanotowano istotnych statystycznie zmian w biomasie badanych roślin (tabela 1), może to wskazywać na wzrost pobierania Zn.

U roślin poddanych ekspozycji na stężenia 50, 100 i 200 μM Zn (Fig. 10 e-j) zanotowano obniżone stężenie Zn w korzeniach dla prawie wszystkich linii roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (oprócz linii 18 przy 50 i 200 μM Zn). Otrzymane wyniki sugerują zahamowanie pobierania Zn z pożywki.

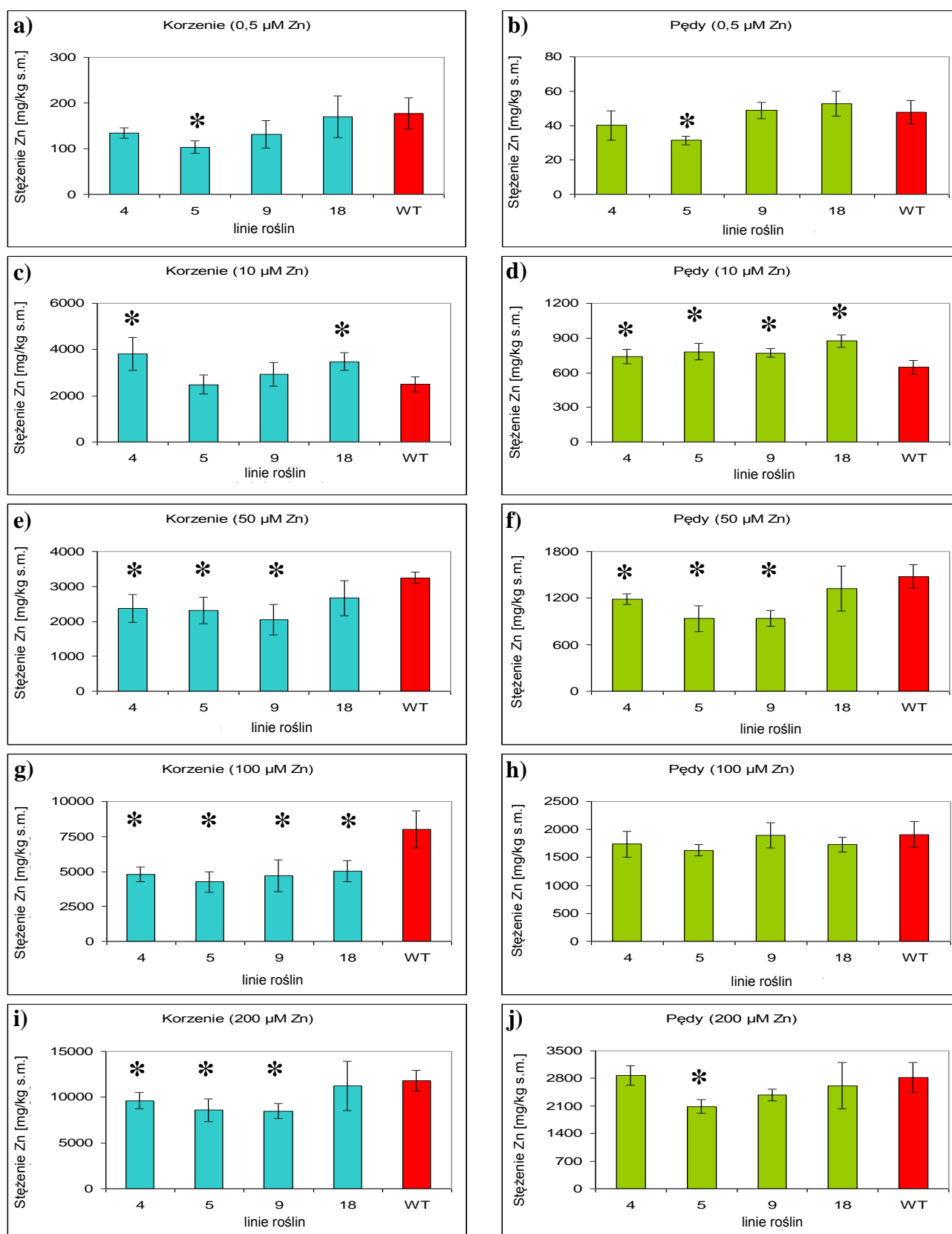


Fig. 10. Stężenie Zn w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18) w korzeniach (a, c, e, g, i) oraz pędach (b, d, f, h, j). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowano w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności: Zn 0,5, 10, 50, 100 lub 200 μ M. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

W celu sprawdzenia czy u roślin transgenicznych następuje zmiana translokacji Zn i Cd z korzeni do pędu w stosunku do roślin typu dzikiego, wykonano obliczenia współczynnika translokacji (TF od ang. **T**ranslocation **F**actor). TF obliczono jako stosunek stężenia danego pierwiastka w pędzie do jego stężenia w korzeniach. Wartość współczynnika translokacji Zn dla roślin poddanych ekspozycji na Zn w zakresie stężeń od 0,5 do 200 μM przedstawiono na Fig. 11. Wartość TF dla roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 0,5, 10, 50 i 200 μM Zn w pożywce jest zbliżona do wartości TF dla roślin typu dzikiego i wynosi ok. 0,25-0,5. Różnice w wartości TF występują u transformantów poddanych ekspozycji na 100 μM Zn (Fig. 11) i wskazują na wyższy poziom translokacji Zn do pędu niż u typu dzikiego.

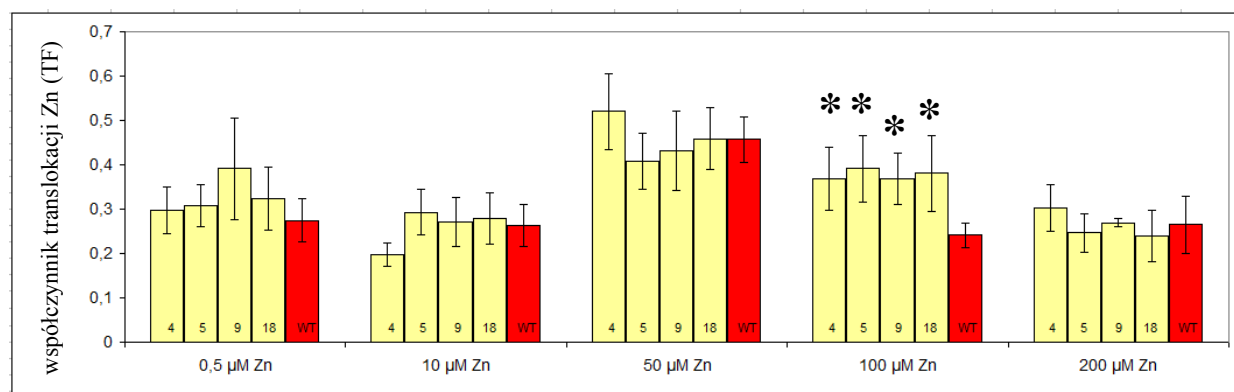


Fig. 11. Współczynnik translokacji określający stosunek stężenia **Zn** pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w stężeniu: Zn 0,5, 10, 50, 100 lub 200 μM . Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Kolejno sprawdzono u roślin transgenicznych poziom akumulacji Cd. Rośliny z ekspresją *AtHMA4-F* hodowane w obecności 0,25 i 5 μM Cd miały wyraźnie (od 2 do 4 razy) zmniejszony poziom stężenia Cd w korzeniach w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 12 a, c). Także w pędzie u roślin hodowanych w obecności 0,25 μM Cd jego stężenie było obniżone (Fig. 12 b). Nie obserwowano różnic w stężeniu Cd w pędzie roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego, gdy hodowano je w obecności 5 μM Cd. Przy braku istotnych różnic w biomacie (tabela 1) otrzymane wyniki wskazują, że u roślin transgenicznych nastąpiło obniżenie pobierania Cd.

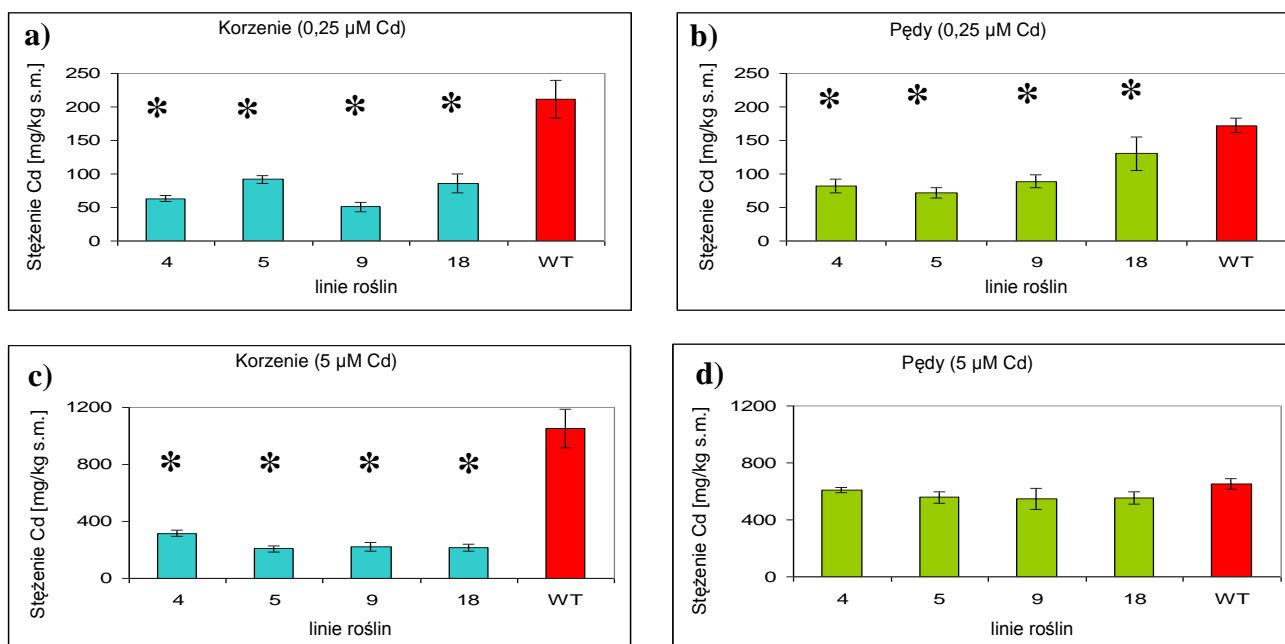


Fig. 12. Stężenie Cd w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18) w korzeniach (a, c) oraz pędach (b, d). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu inkubowano w płynnej pożywce ¼ Knop'a, a następnie w stężeniu Cd 0,25 μM lub Cd 5 μM. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Aby ocenić poziom translokacji Cd, określono wartość współczynnika translokacji dla Cd u roślin hodowanych w obecności 0,25 lub 5 μM Cd, a wynik przedstawiono na Fig. 13. TF u roślin transgeniczných jest na poziomie od 1,5 do 2, natomiast u roślin typu dzikiego wynosi 1 (0,25 μM Cd) i 0,5 (5 μM Cd) (Fig. 13). Na tej podstawie można stwierdzić, że poziom translokacji Cd z korzenia do pędu jest większy u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na Cd w porównaniu z roślinami typu dzikiego.

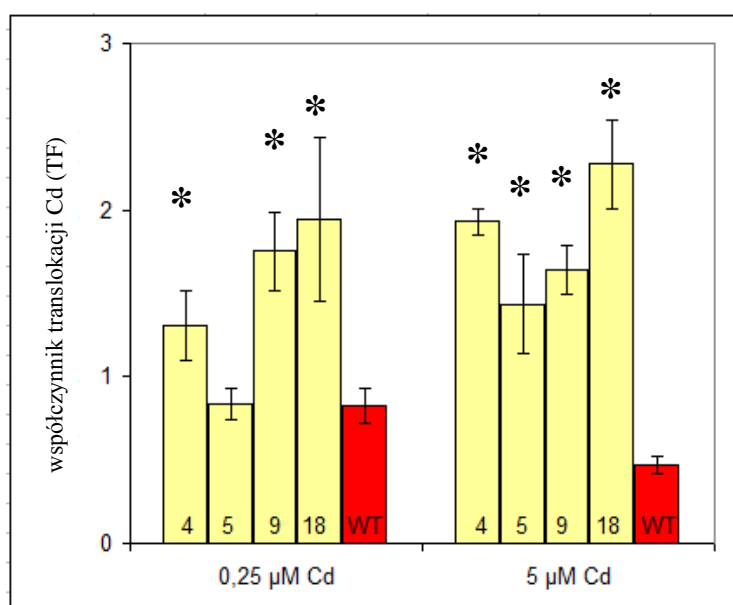


Fig. 13. Stosunek stężenia Cd pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Dodatkowo zbadano akumulację Zn w roślinach hodowanych w obecności Cd. Rośliny z ekspresją *AtHMA4-F* hodowane przy stężeniu 0,25 i 5 μM Cd w pożywce miały zmniejszone stężenie Zn w korzeniach w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 14 a, c). Stężenie Zn w pędzie u roślin transformowanych było na poziomie zbliżonym do typu dzikiego (hodowla w obecności 0,25 μM , Fig. 14 b) lub wyższe (hodowla w obecności 5 μM Cd, Fig. 14 d). Otrzymane wyniki, przy braku istotnych różnic w biomase (tabela 1) wskazują, że u roślin transgenicznych nastąpiło obniżenie pobierania Zn.

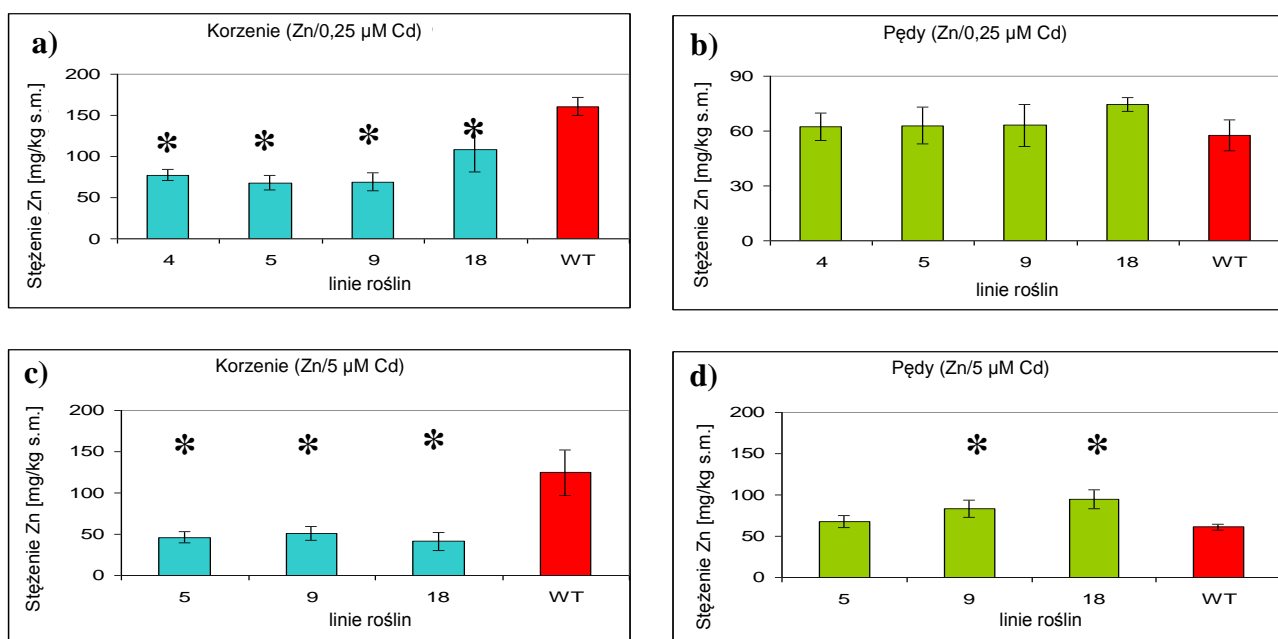


Fig. 14. Stężenie Zn w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18) w korzeniach (a, c) oraz pędach (b, d). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu inkubowano w płynnej pożywce ¼ Knop'a, a następnie w stężeniu Cd 0,25 μM lub Cd 5 μM (brak wyniku dla linii 4). Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego, oznaczono gwiazdką.

Następnie określono współczynnik translokacji Zn u roślin hodowanych w obecności Cd. Wartość TF dla Zn u roślin transgenicznych hodowanych w obecności 0,25 μM Cd wynosi ok. 1 natomiast u rosnących w obecności 5 μM Cd ok. 1,5 – 2 (Fig. 15). U roślin typu dzikiego TF nie przekraczał 0,5, jednak podobnie jak u transformantów wzrastał z 0,36 przy hodowli roślin w obecności 0,25 μM Cd do 0,47 gdy rośliny rosły w obecności 5 μM Cd. Ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi więc do wzrostu poziomu translokacji Zn do pędu w porównaniu do roślin typu dzikiego hodowanych w obecności Cd.

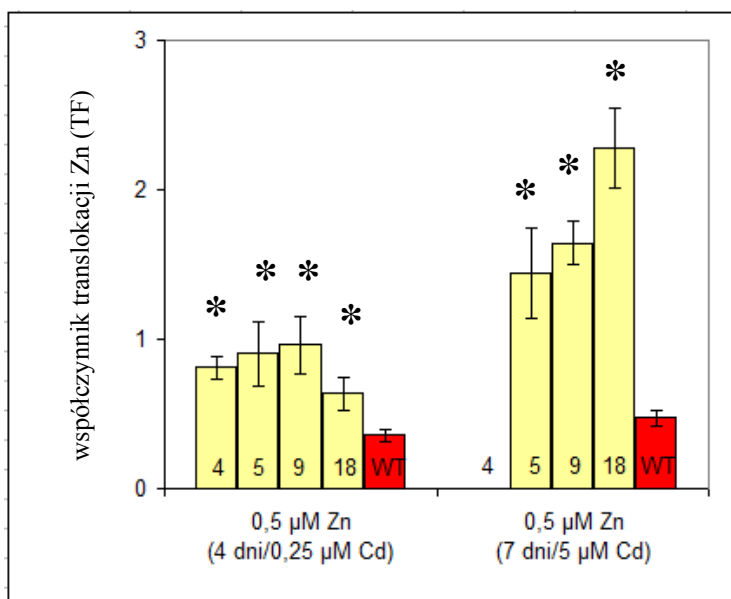


Fig. 15. Współczynnik translokacji określający stosunek stężenia **Zn** pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 4, 5, 9, 18). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w stężeniu: Zn 0,5 i z dodatkiem Cd 0,25 lub 5 μM. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego, oznaczono gwiazdką. Brak wyników pomiarów stężeń Zn dla linii 4 ekspozycja na 5 μM

Podsumowując wszystkie powyższe wyniki należy podkreślić, że ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do wzrostu translokacji Zn i Cd, gdy rośliny hodowane są w obecności Cd. Wzrost translokacji Zn obserwujemy także u roślin transformowanych hodowanych w obecności 10 i 100 μM Zn. Jednak tylko w obecności 10 μM Zn następuje wzrost stężenia Zn w pędzie u roślin transgenicznych. Zaskakujące jest także to, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* następuje ograniczenie pobierania Zn i Cd z pożywki, choć wiadomo, że wprowadzone białko nie odpowiada za pobieranie pierwiastków.

4.3.1.2. Akumulacja oraz poziom translokacji Zn i Cd u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-T*

Rośliny z ekspresją *AtHMA4-T* (białko AtHMA4 bez końca C) zostały poddane ekspozycji na stężenia Zn 0,5 (warunki kontrolne), 10, 100 i 200 μM. Gdy rośliny hodowano w obecności 0,5 i 10 μM Zn stężenie Zn w korzeniach i pędzie u roślin transformowanych było na poziomie zbliżonym do roślin typu dzikiego (Fig. 16 a-d). Z kolei niższe stężenie Zn w pędach występowało dla trzech linii (nr 9, 12, 16) roślin z ekspresją *AtHMA4-T* hodowanych przy 100 μM Zn (Fig. 16 f) i dwóch linii (nr 9, 12) przy 200 μM Zn (Fig. 16 h).

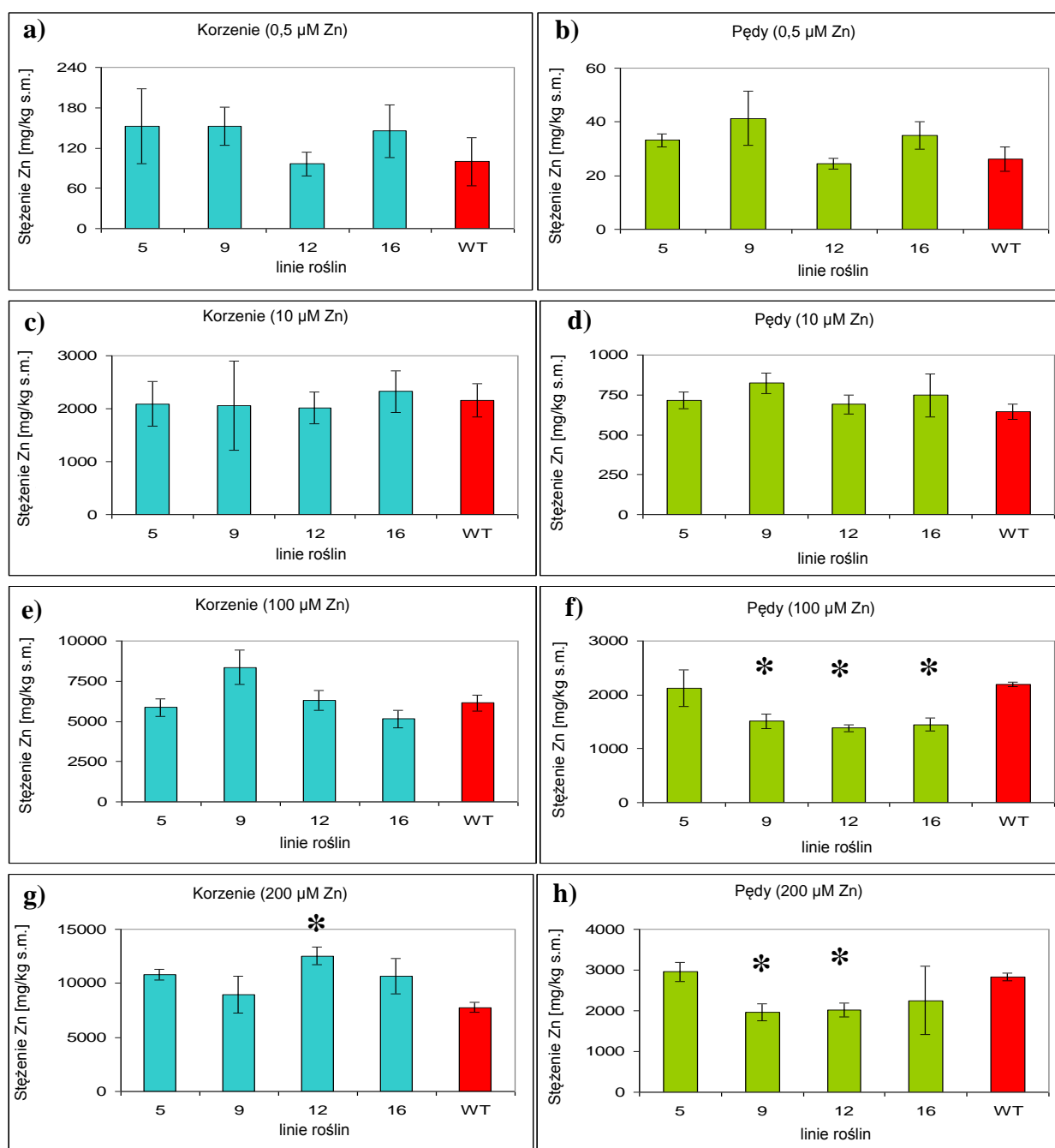


Fig. 16. Stężenie **Zn** w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16) w korzeniach (a, c, e, g) oraz pędach (b, d, f, h). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie ze stężeniem cynku: 0,5 (a-b); 10 (c-d); 100 (e-f) lub 200 (g-h) μM Zn. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Aby sprawdzić czy u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* nastąpiło obniżenie poziomu translokacji Zn obliczono współczynnik translokacji (TF). Wartość TF dla roślin z ekspresją *AtHMA4-T* oraz typu dzikiego, hodowanych w obecności różnego poziomu Zn w pożywce wynosi ok. 0,3-0,4 (Fig. 17), wskazując, że stężenie Zn w korzeniu jest znacząco wyższe niż w pędzie. Wyniki wskazują na tendencję do obniżania poziomu translokacji Zn u roślin transgeniczných hodowanych w obecności 100 i 200 μM Zn.

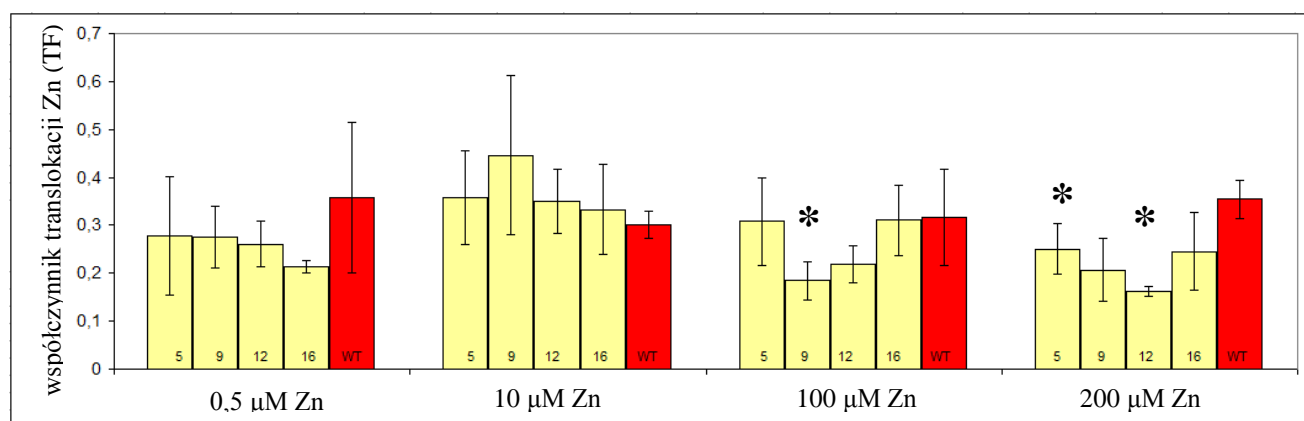


Fig. 17. Stosunek stężenia Zn pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności: 0,5, 10, 100 lub 200 μM Zn. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Przeprowadzono także badanie mające na celu określenie czy ekspresja *AtHMA4-T* w tytoniu modyfikuje akumulację Cd. Okazało się, że nie wszystkie linie tytoniu z ekspresją *AtHMA4-T* poddane ekspozycji na 0,25 i 5 μM Cd odpowiadały w ten sam sposób, jak rośliny typu dzikiego. U roślin transformowanych hodowanych w obecności 0,25 μM Cd w korzeniach linii nr 16 (Fig. 18 a) oraz w pędach linii nr 12 i 16 (Fig. 18 b) stężenie Cd pozostało niezmiennione. W tych samych warunkach stężenie Cd było o ok. 20% obniżone w korzeniach roślin transgeniczných linii nr 5, 9, 12 (Fig. 18 a) oraz pędach linii nr 5, 9 (Fig. 18 b). Podobnie u roślin hodowanych w obecności 5 μM Cd, nie było różnic w stężeniu tego metalu w korzeniach linii nr 5 i 16 (Fig. 18 c) oraz pędach linii nr 5, 9, 12 (Fig. 18 d). Niewielkie obniżenie stężenia Cd następowało w korzeniach linii nr 9 i 12 (Fig. 18 c), natomiast zwiększenie jego stężenia w pędach linii nr 16 (Fig. 18 d) u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 5 μM Cd.

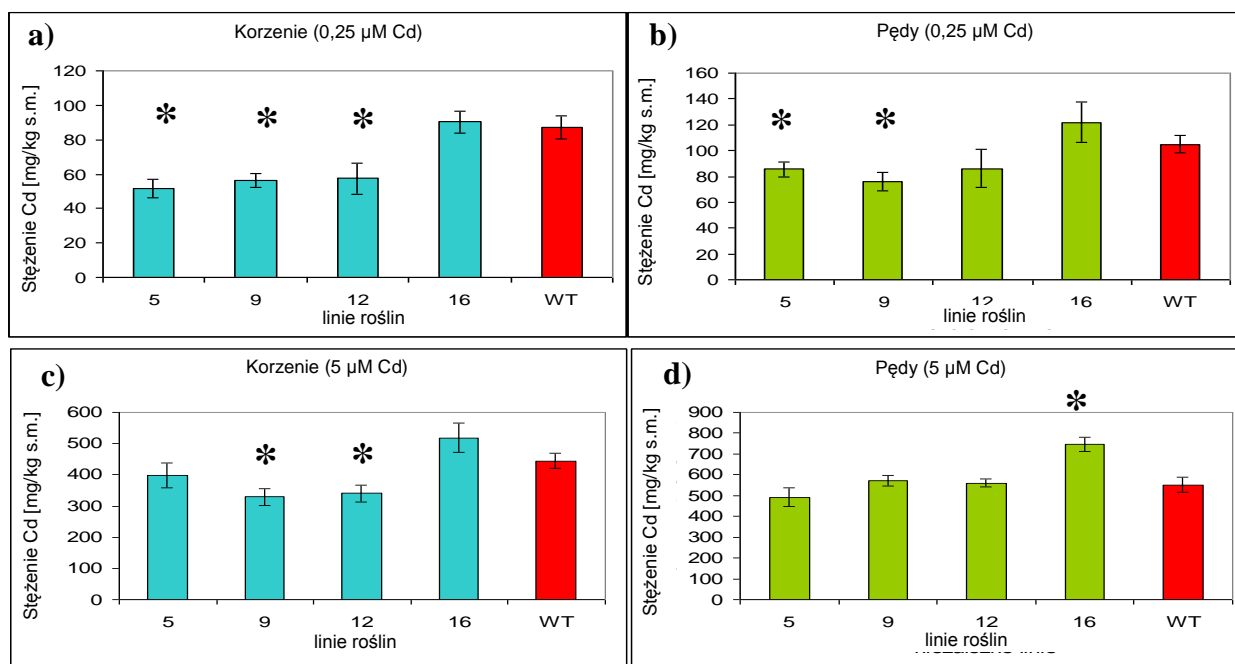


Fig. 18. Stężenie Cd w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16) w korzeniach (a, c) oraz pędach (b, d). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie ze stężeniem: 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Współczynnik translokacji Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* nie różni się w znaczący sposób od typu dzikiego zarówno podczas hodowli w obecności niskiego (0,25 μM), jak i wysokiego (5 μM) stężenia Cd (Fig. 19). W tym drugim wypadku dwie linie roślin transgenicznych (nr 9 i 12) miały podwyższony TF w stosunku do typu dzikiego. Otrzymane wyniki wskazują, że obecność transgeny nie zmienia istotnie poziomu translokacji Cd z korzenia do pędu.

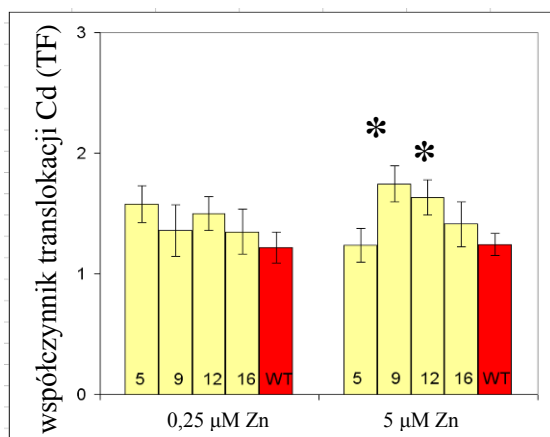


Fig. 19. Stosunek stężenia Cd pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a, a następnie w obecności 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wyniki reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

U transformantów poddanych ekspozycji na 5 μM Cd zbadano także poziom stężenia Zn. Okazało się, że jego stężenie było na zbliżonym poziomie w korzeniu (Fig. 20 a) u roślin

transformowanych i typu dzikiego, natomiast w pędzie można było zaobserwować nieznaczne podwyższenie jego stężenia u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* (Fig. 20 b). Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja *AtHMA4-T* w bardzo niewielkim stopniu zmienia poziom akumulacji Zn w roślinach hodowanych w obecności Cd. W kolejnym etapie obliczono współczynnik translokacji Zn w roślinach rosnących na pożywce z Cd.

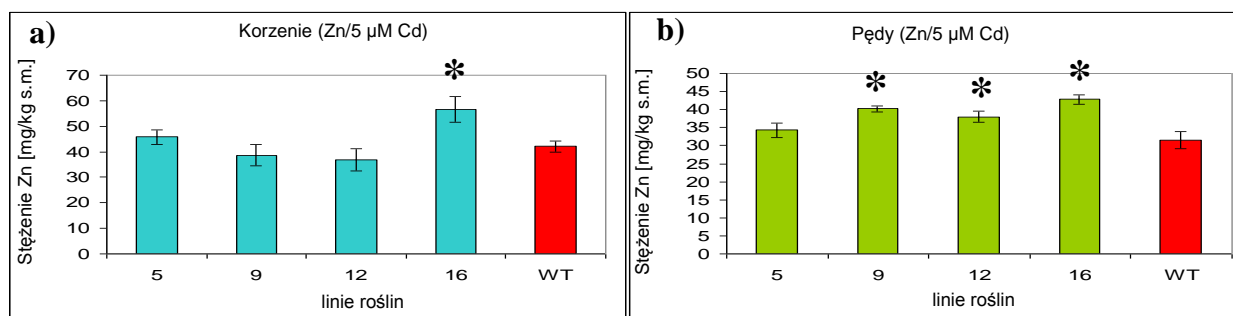


Fig. 20. Stężenie **Zn** w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16) w korzeniach (a) oraz pędach (b) sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie ze stężeniem 5 μ M Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Wartość współczynnika translokacji Zn w roślinach hodowanych w obecności Cd (5 μ M) wskazuje na niewielki wzrost poziomu translokacji Zn do pędu u roślin transgeniczných linii nr 9 i 12 (Fig. 21). Podsumowując można wywnioskować, że wprowadzenie transgenu w niewielkim stopniu wpływa na zmianę poziomu translokacji Zn u roślin hodowanych w obecność Cd.

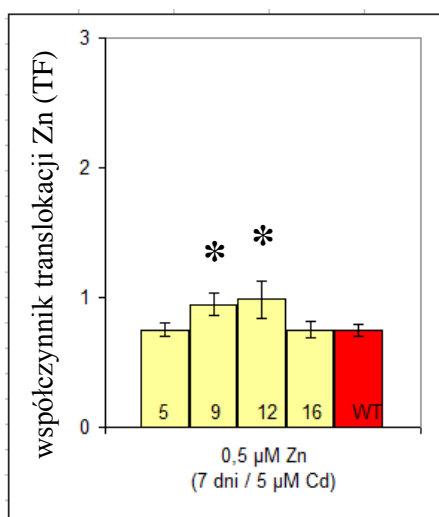


Fig. 21. Stosunek stężenia **Zn** pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-T* (linie nr 5, 9, 12, 16). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a, a następnie w obecności 5 μ M Cd. Poszczególne wyniki reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

4.3.1.3. Akumulacja oraz poziom translokacji Zn i Cd u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C*

Rośliny z ekspresją *AtHMA4-C* (jedynie koniec C) zostały poddane ekspozycji w warunkach hodowli hydroponicznej na stężenia Zn 0,5 (warunki kontrolne), 10, 100 i 200 μM . Rośliny transgeniczne hodowane w obecności 0,5 μM Zn akumulowały większe stężenie Zn zarówno w korzeniach jak i pędach w stosunku do roślin typu dzikiego (Fig. 22 a-b). Taki wynik oraz brak statystycznie istotnych różnic w biomasie pomiędzy roślinami transformowanymi i typu dzikiego może świadczyć o wzroście pobierania Zn u roślin z ekspresją *AtHMA4-C*.

U roślin transgenicznych hodowanych w obecności 10 μM Zn w pożywce zanotowano zwiększenie stężenia Zn w korzeniach (linie 6, 14, 16, Fig. 22 c) i pędzie (linie 14 i 16, Fig. 22 d). U roślin z ekspresją *AtHMA4-C* poddanych ekspozycji na stężenia 100 i 200 μM Zn nie zaobserwowano znaczących zmian stężenia Zn w korzeniach (Fig. 22 e, g) a tylko niewielkie obniżenie stężenia Zn w pędach (Fig. 22 f, h) w porównaniu do roślin typu dzikiego, co wskazuje na niewielkie zahamowanie translokacji Zn z korzeni do pędu.

Podsumowując, wprowadzenie *AtHMA4-C* do tytoniu prowadzi do wzrostu pobierania Zn, gdy jego stężenie w pożywce jest niskie, a tendencja ta zmniejsza się wraz ze zwiększaniem zaopatrzenia roślin w Zn z pożywki.

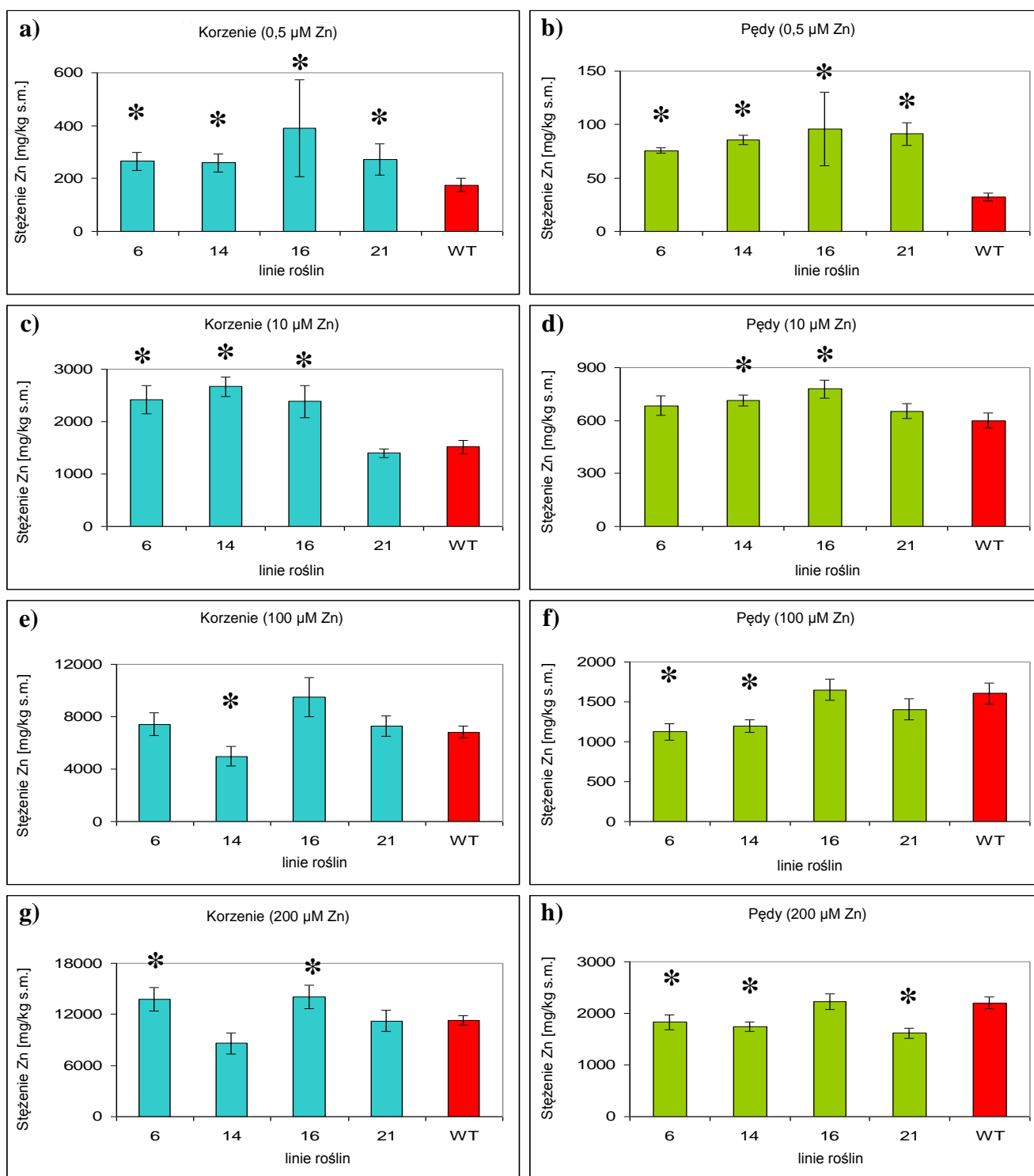


Fig. 22. Stężenie **Zn** w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21) w korzeniach (a, c, e, g) oraz pędach (b, d, f, h). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności stężenia: 0,5 μ M (a-b); 10 μ M (c-d); 100 μ M (e-f) lub 200 μ M (g-h) Zn. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

W następnym etapie, aby potwierdzić przypuszczenia o zmianie poziomu translokacji Zn u roślin transformowanych obliczono współczynnik translokacji (TF). Wartość TF dla cynku u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* oraz typu dzikiego hodowanych w obecności od 0,5 do 200 μ M Zn w pożywce

wynosi ok. 0,2-0,4 (Fig. 23). U roślin transgenicznych hodowanych w obecności 0,5 μM Zn następował wzrost TF wskazujący na wzrost translokacji Zn do pędu w porównaniu do roślin typu dzikiego. W pozostałych wariantach hodowli roślin (10, 100 i 200 μM Zn) wartość TF była równa lub niższa u roślin transgenicznych, niż u roślin typu dzikiego (Fig. 23). Takie wyniki świadczą o tendencji do obniżania poziomu translokacji Zn do pędu roślin transgenicznych przy wyższych stężeniach Zn niż kontrolne.

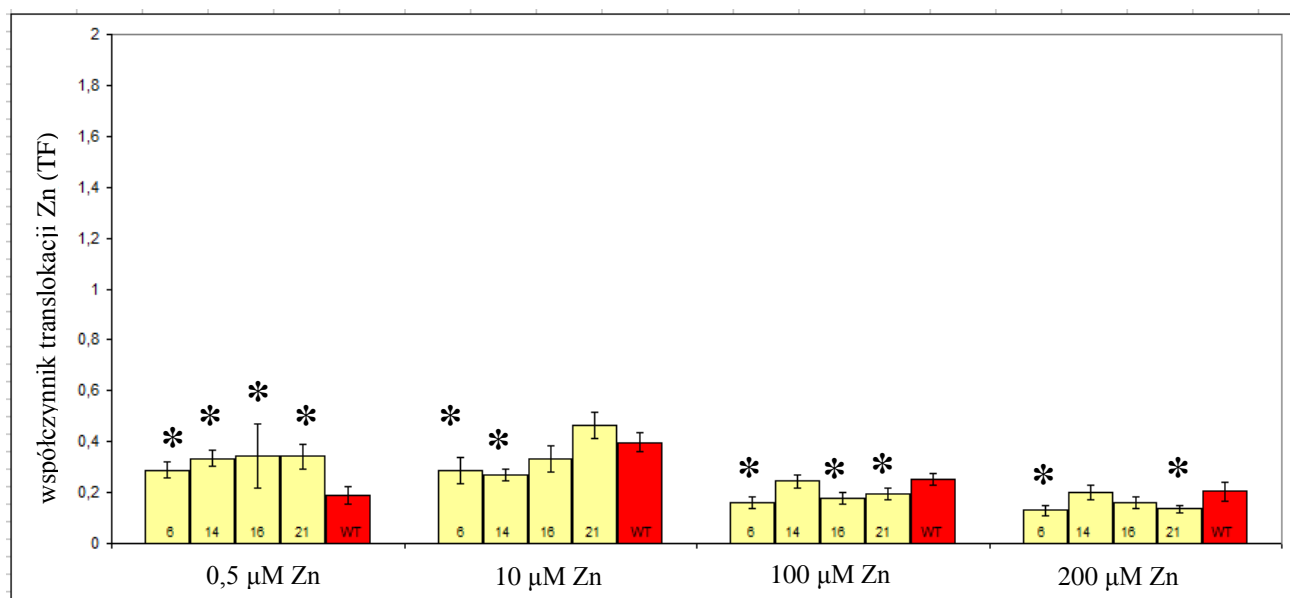


Fig. 23. Stosunek stężenia **Zn** pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności: 0,5, 10, 100 lub 200 μM Zn. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Kolejno zbadano poziom akumulacji Cd w roślinach z ekspresją *AtHMA4-C*. U roślin transgenicznych poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd następowało znaczące (2-3 krotnie) zwiększenie stężenia Cd w korzeniach (Fig. 24 a) oraz pędach (Fig. 24 b), co przy niezmienionej biomase pomiędzy roślinami transgenicznymi a typu dzikiego może sugerować wzrost pobierania Cd z pożywki.

W korzeniach roślin poddanych ekspozycji na 5 μM Cd, stężenie tego metalu było na zbliżonym poziomie u badanych roślin. W pędach roślin z ekspresją *AtHMA4-C* występuje tendencja do zwiększonej akumulacji Cd (Fig. 24 d), co może świadczyć o niewielkim wzroście translokacji tego pierwiastka z korzeni do pędów. Aby to potwierdzić wykonano obliczenia współczynnika translokacji Cd.

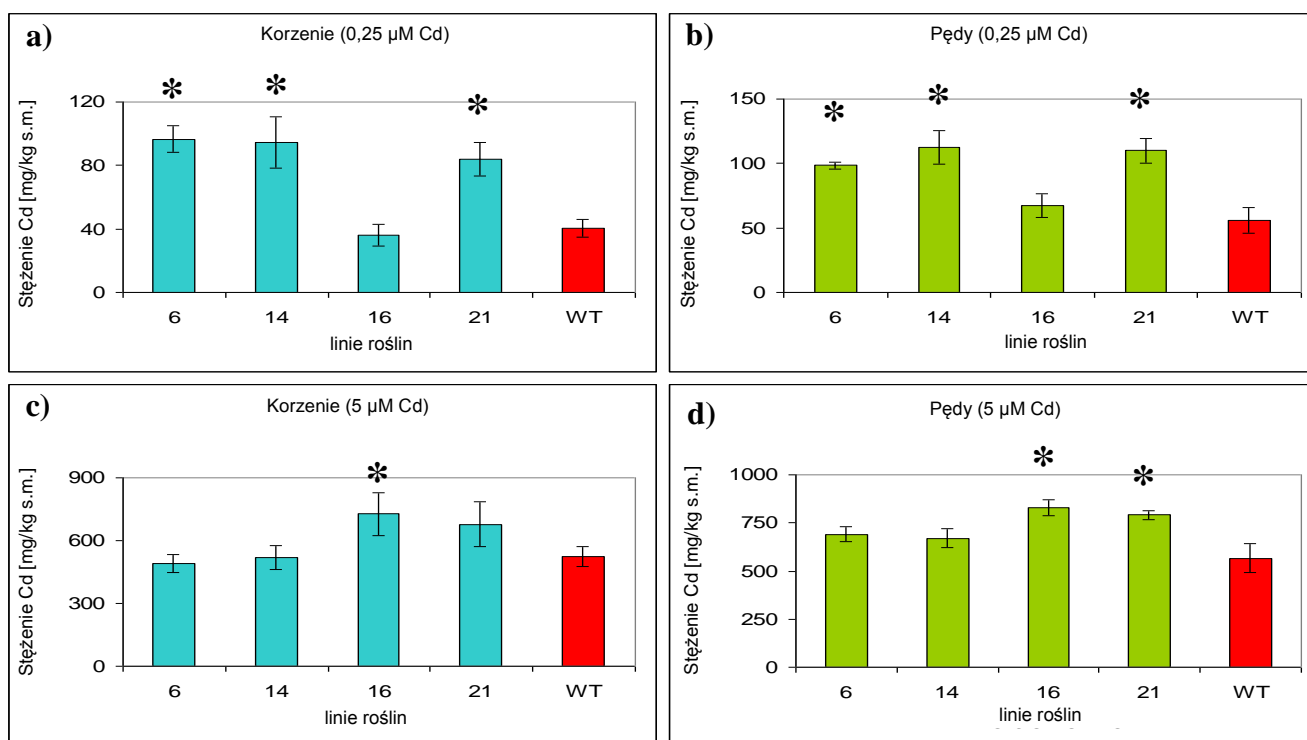


Fig. 24. Stężenie Cd w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21) w korzeniach (a, c) oraz pędach (b, d). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności: 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Współczynnik translokacji dla Cd przedstawiony na Fig. 25 wynosił ok. 1,2 zarówno dla roślin z ekspresją *AtHMA4-C* jak i typu dzikiego, co wskazuje, że transformacja nie prowadzi do istotnych zmian w poziomie translokacji Cd z korzenia do pędu, zatem nie zmienia dystrybucji Cd pomiędzy korzeniem a pędem.

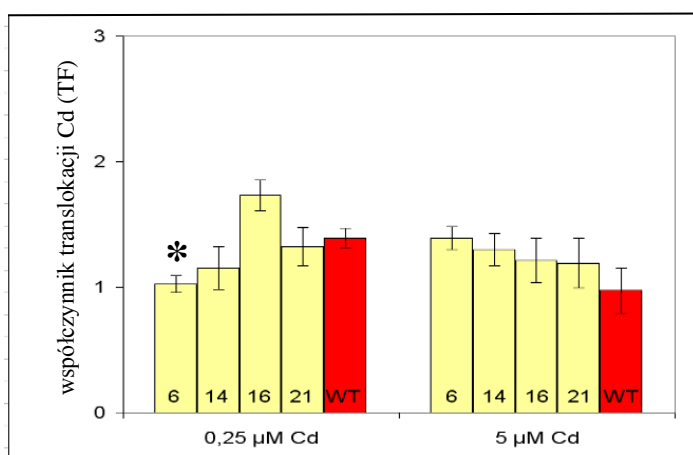


Fig. 25. Stosunek stężenia Cd pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności: 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

W tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C* zbadano także poziom akumulacji Zn, gdy rośliny hodowano w obecności Cd. Otrzymane wyniki wskazują, że stężenie Zn w korzeniach roślin transformowanych hodowanych w obecności 0,25 μM Cd było większe w dwóch z czterech linii (nr. 6 i 14) w stosunku do roślin typu dzikiego (Fig. 26 a). Natomiast stężenie Zn w pędach było już

wyraźnie podwyższone we wszystkich liniach roślin transgenicznych w stosunku do roślin typu dzikiego (Fig. 26 b). U roślin hodowanych w obecności 5 μM Cd stężenie Zn utrzymywało się na zbliżonym poziomie jak u roślin typu dzikiego, jedynie w pędach linii 6 i 16 stężenie Zn było w niewielkim stopniu podwyższone względem roślin nietransformowanych.

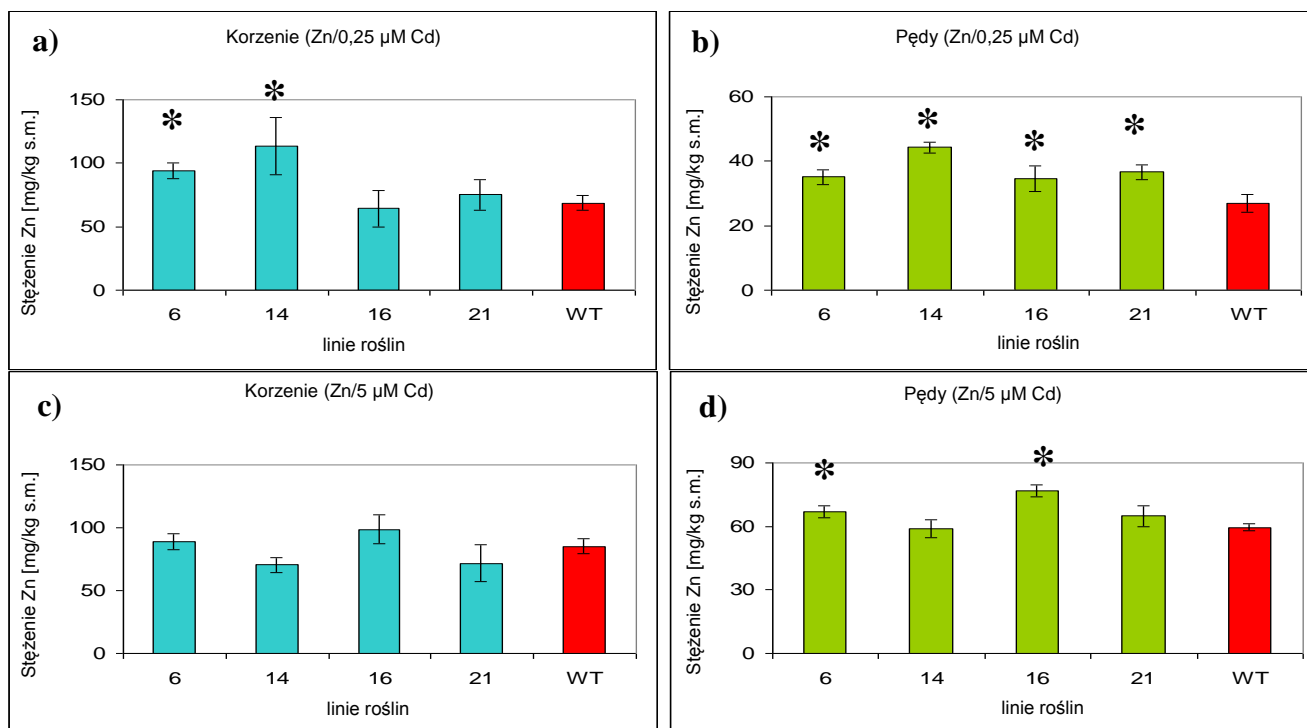


Fig. 26. Stężenie Zn w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21) w korzeniach (a, c) oraz pędach (b, d). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności 0,25 lub 5 μM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii \pm odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Wyliczono także współczynnik translokacji (TF) Zn dla roślin hodowanych w obecności Cd. Dodanie 0,25 μM Cd prowadzi do wzrostu TF dla Zn zarówno u roślin transgenicznych jak i typu dzikiego do ok. 0,5, a dodanie 5 μM Cd do ok. 0,8 (Fig. 27). U roślin tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C*, podobnie jak u pozostałych transformantów, w obecności Cd rośnie poziom stężenia Zn w pędzie.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-C* hodowanych w obecności Cd (0,25 i 5 μM) nie zaobserwowano znaczących różnic w TF dla Zn w porównaniu do roślin typu dzikiego, co wskazuje, że translokacja Zn z korzeni do pędów jest niezmienną u transformantów, gdy rośliny hodowano w obecności Cd (Fig. 27).

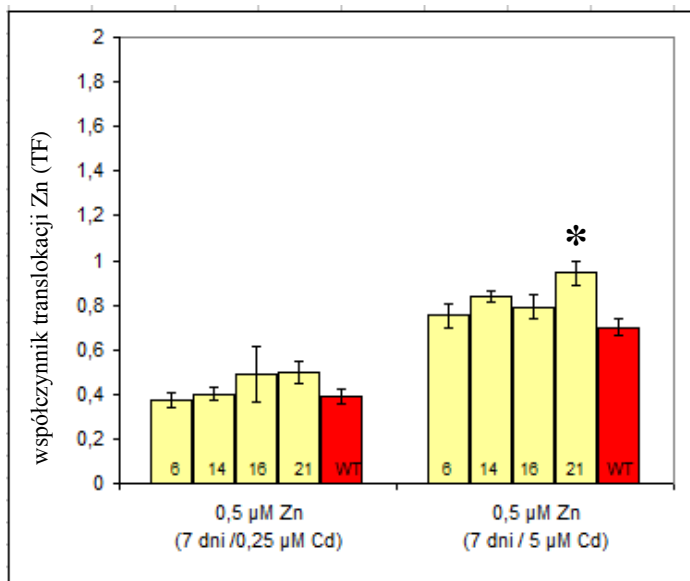


Fig. 27. Stosunek stężenia **Zn** pomiędzy pędem a korzeniem w roślinach typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C* (linie nr 6, 14, 16, 21). Sześciotygodniowe rośliny tytoniu hodowane w pożywce płynnej ¼ Knop'a i następnie w obecności 0,25 lub 5 µM Cd. Poszczególne wartości reprezentują średnią dla sześciu roślin z danej linii ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Podsumowując, ekspresja *AtHMA4-C* prowadzi do wzrostu stężenia Zn w korzeniach tytoniu (gdy rośliny rosną w obecności 0,5 i 10 µM Zn w pożywce). Wyniki wskazują na indukcję endogennego systemu pobierania tego metalu. Efekt ten zanika, gdy w pożywce znajdują się jony kadmu - w takich warunkach transformanty akumulują więcej Cd w korzeniach (prawdopodobnie w wyniku bardziej intensywnego pobierania).

4.3.2. Poziom tolerancji na Zn i Cd u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T*, *AtHMA4-C*

4.3.2.1. Poziom tolerancji na Zn u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C*

Rośliny wszystkich linii używanych w doświadczeniach poddane ekspozycji na Zn w stężeniu od 0,5 do 50 µM nie wykazywały różnic w wielkości i wyglądzie. Wyraźne różnice w poziomie tolerancji na Zn pomiędzy roślinami transformowanymi, a typu dzikiego zaobserwowano w trakcie 6-dniowej hodowli w obecności 100 i 200 µM Zn.

U roślin typu dzikiego wyraźne objawy toksyczności wynikające z nadmiaru Zn były widoczne podczas hodowli w obecności 200 µM Zn. Pojawiające się u tych roślin nekrozy były drobne, okrągłe, o barwie od brązowej do jasno-szarej i białej. Na Fig. 28 pkt. c i d i Fig. 29 przedstawiono zdjęcia prezentujące nekrozy.

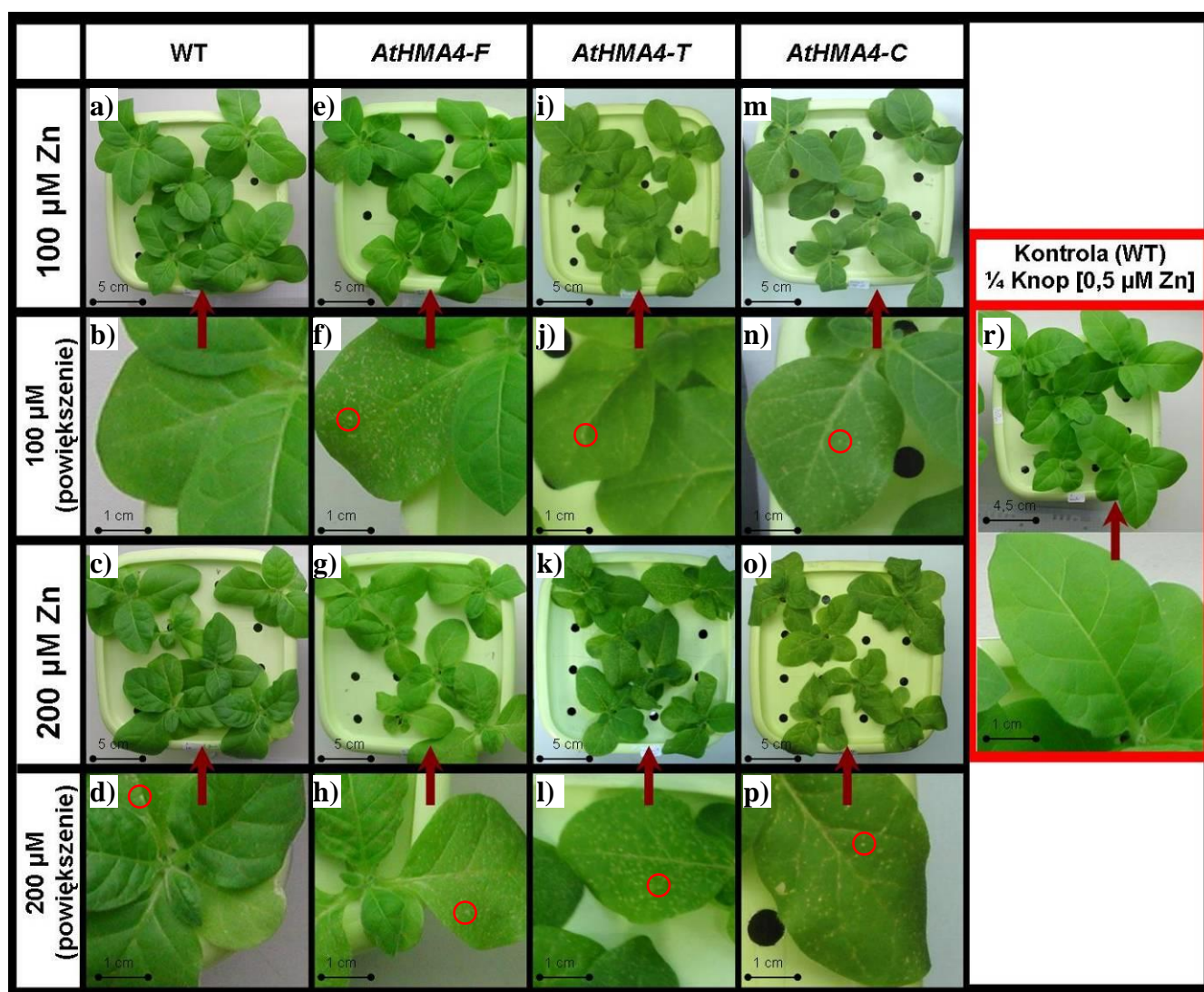


Fig. 28. Wygląd sześciotygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 100 i 200 μM Zn przez 6 dni - rośliny typu dzikiego (WT; a-d) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* (e-h), *AtHMA4-T* (i-l), *AtHMA4-C* (m-p). Powiększenia pojedynczych roślin/liści mając na celu pokazanie objawów toksyczności - nekroz (b, f, j, n, d, h, l, p). Dla porównania rośliny hodowane w warunkach kontrolnych ($\frac{1}{4}$ pożywki Knop – 0,5 μM Zn) przez taki sam okres (r). Przykłady objawów toksyczności w postaci nekroz wskazano przy pomocy czerwonego kółka (○). Wszystkie wyniki reprezentują wybrane zdjęcia z jednego z trzech powtórzeń doświadczeń.

Należy dodać, że u roślin typu dzikiego w czasie ekspozycji na 200 μM Zn zaobserwowano pojawianie się nekroz w charakterystycznej kolejności, początkowo na dolnych liściach a następnie stopniowo na kolejnych górnych liściach (Fig. 29), tymczasem w obecności 100 μM w pożywce pojawiały się nieliczne nekrozy, jednak dopiero około 6-go dnia. Oprócz nekroz, rośliny hodowane w obecności wysokich stężeń Zn (powyżej 100 μM) wykazują zwiększoną sztywność/łamliwość liści oraz zahamowanie wzrostu w stosunku do roślin rosnących w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn). Pojedyncze nekrozy można było również zaobserwować na liściach nielicznych roślin typu dzikiego pod koniec hodowli (6 dnia ekspozycji) w obecności 100 μM Zn.

Ekspresja genów *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T*, *AtHMA4-C* w tytoniu spowodowała pojawienie się objawów toksyczności w formie nekroz zdecydowanie wcześniej niż u roślin typu dzikiego.

Podczas hodowli na pożywce zawierającej 100 μM Zn pierwsze nekrozy pokazywały się już 2-go dnia dla roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, i 3-4-go dla roślin z ekspresją *AtHMA4-T*, *AtHMA4-C* (Fig. 28 f, j, n). Ekspozycja na 200 μM prowadziła do powstania nekroz już 2-go dnia u wszystkich roślin transformowanych wariantami *AtHMA4*, przy czym u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* są one zdecydowanie bardziej liczne niż u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C*. Najmniejszą ilość nekroz obserwowano u roślin typu dzikiego. Charakterystyczne jest to, że u roślin transgenicznych objawy toksyczności pojawiają się na liściach górnych i dolnych równocześnie, natomiast u roślin typu dzikiego najpierw na liściach dolnych (Fig 28 i 29).

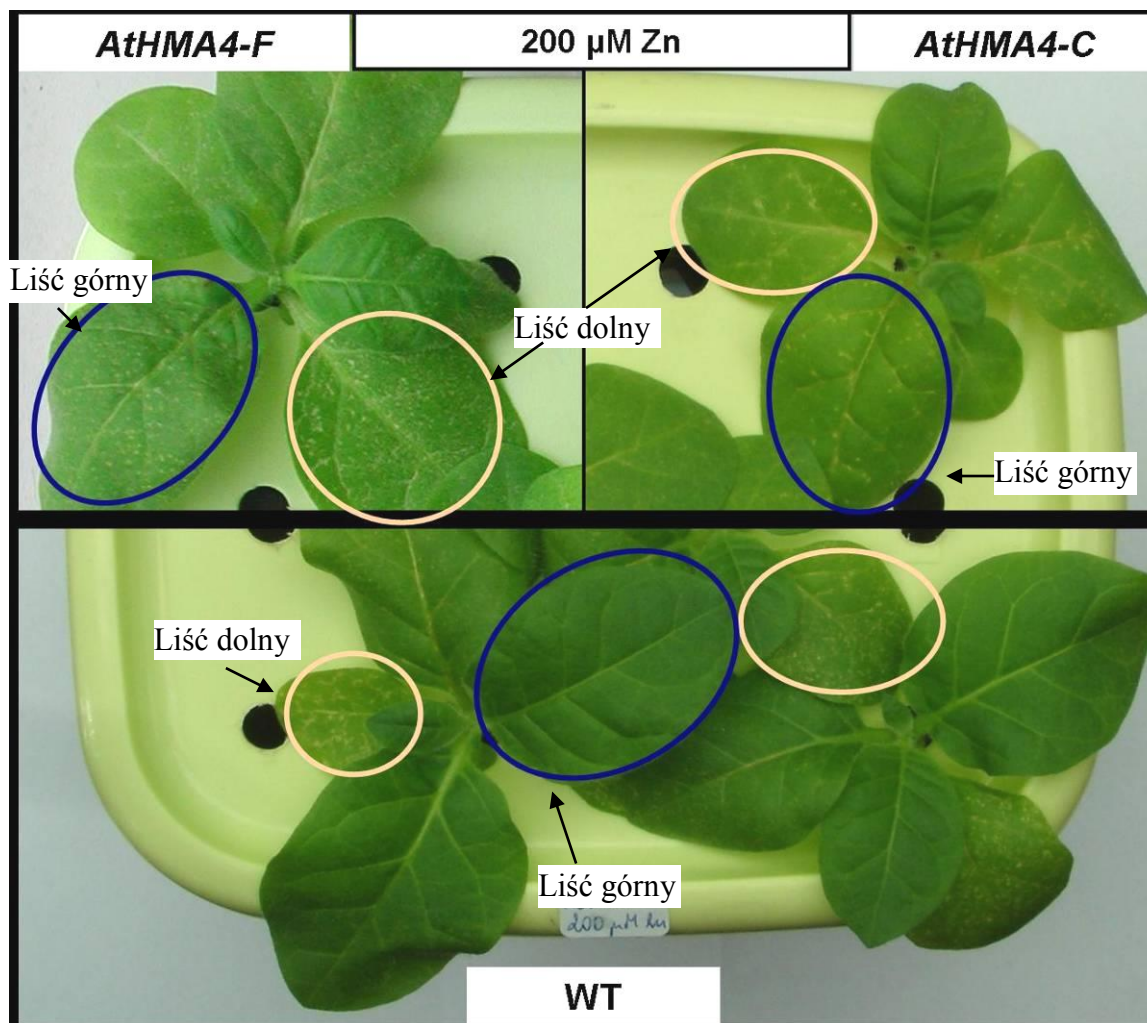


Fig. 29. Rozmieszczenie nekroz u sześciotygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 200 μM Zn przez 6 dni - rośliny typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C*. Niebieskim kółkiem oznaczono liście górne, beżowym liście dolne.

Powstawanie u roślin transgenicznych większej liczby nekroz niż u roślin typu dzikiego wskazuje na obniżenie poziomu tolerancji na Zn w wyniku ekspresji *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C*. Warto zauważyć, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* obserwowane nekrozy mają inny wygląd niż te obserwowane u roślin typu dzikiego oraz z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-T* (Fig. 30).

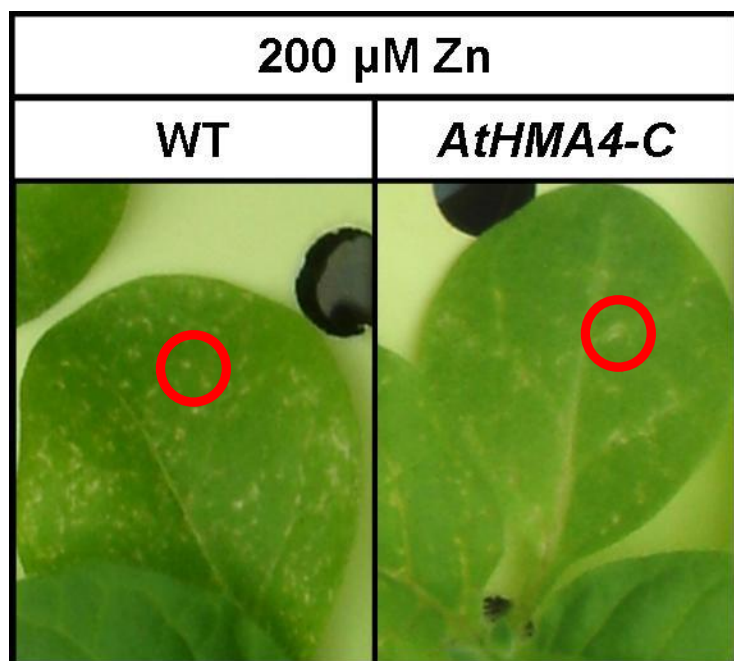


Fig. 30. Wygląd nekroz u sześciotygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 200 μ M Zn przez 6 dni - rośliny typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-C*. Pokazano dolne liście. Przykłady nekroz wskazano przy pomocy czerwonego kółka (○)

U roślin z ekspresją *AtHMA4-C* nekrozy są większe, podłużne i lokalizują się w okolicy nerwów. Odmienny niż u roślin typu dzikiego (Fig. 30) oraz z ekspresją *AtHMA4-F* i *-T* (Fig. 28 f, j) kształt oraz lokalizacja nekroz występujących u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* może wskazywać na inny mechanizm ich generowania.

4.3.2.2. Poziom tolerancji na Cd u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C*

Rośliny wszystkich badanych linii poddane ekspozycji na 0,25 μ M Cd nie różniły się wielkością i wyglądem pomiędzy sobą, a także w porównaniu do roślin rosnących w warunkach kontrolnych bez Cd. Zastosowanie wyższego stężenia Cd (5 μ M) pokazało zwiększoną tolerancję na ten metal roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-T*. Przejawiało się to mniejszą liczbą nekroz w porównaniu do typu dzikiego (Fig. 31). Nekrozy, bardziej liczne na liściach roślin typu dzikiego, były obszerne, o barwie od ciemnozielonej do jasnoszarej i białej, a ich kształt był nieregularny. Początkowo miały one postać niedużych wklęsłych plam, najczęściej pomiędzy unerwieniem blaszki liściowej.

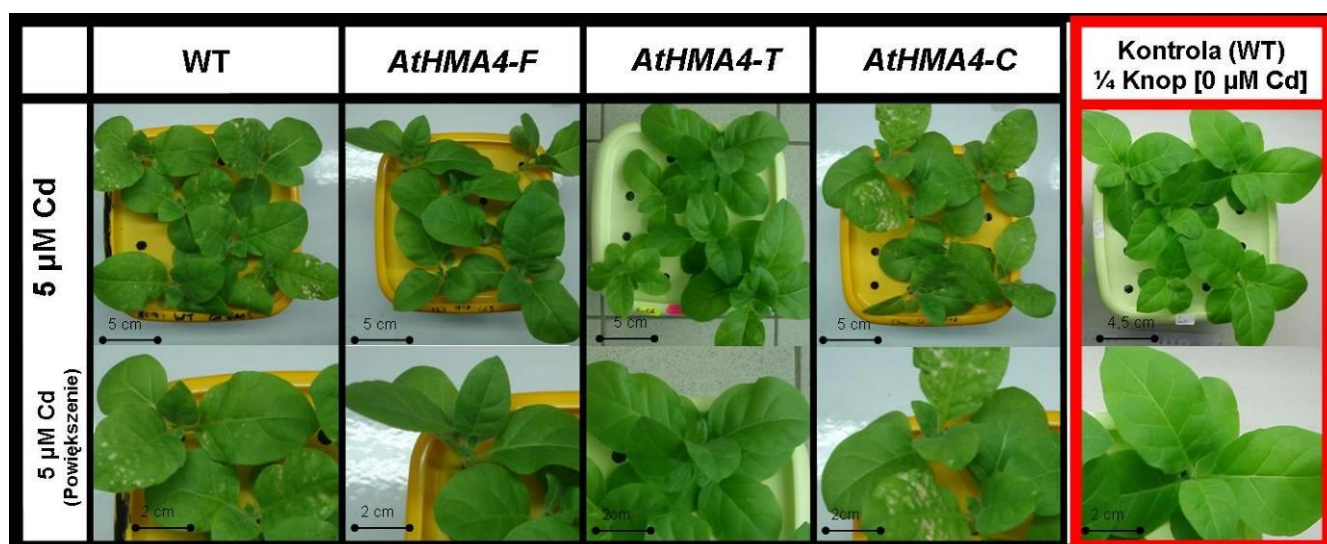


Fig. 31. Objawy toksyczności Cd (nekrozy) powstające u sześciotygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 5 μM Cd przez 6 dni - rośliny typu dzikiego (WT) oraz z ekspresją *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C*. Dolny panel prezentuje powiększenia pojedynczych roślin/liści. Dla porównania rośliny hodowane w warunkach kontrolnych (1/4 stężenia pożywki Knopa – 0,5 μM Zn) przez taki sam okres (prawa czerwona kolumna)

Z kolei rośliny z ekspresją *AtHMA4-C* charakteryzują się obniżonym w stosunku do typu dzikiego, poziomem tolerancji na Cd, co objawiało się występowaniem większych nekroz (Fig. 31).

4.3.3. Podsumowanie

Wykonane doświadczenia pokazały, że wprowadzenie do roślin tytoniu genów *AtHMA4-F*, *AtHMA4-T* i *AtHMA4-C* prowadzi do zmian w akumulacji Zn i Cd. Jednak **kierunek i wielkość zmian zależy od stężenia Zn lub Cd w pożywce.**

Badane rośliny transgeniczne wykazują również zmieniony w stosunku do typu dzikiego poziom tolerancji na Zn i Cd.

Spośród otrzymanych wyników najbardziej interesujące to:

- a) wyniki wskazujące, że **w tytoniu ekspresja genu *AtHMA4-F*** (kodującego białko, które nie bierze udziału w pobieraniu Zn lub Cd) prowadzi do obniżenia pobierania tych pierwiastków, gdyż stwierdzono:
 - obniżenie stężenia Zn w korzeniach roślin poddanych ekspozycji na 100 μM Zn, przy niezmienniej biomasie
 - obniżenie stężenia Cd w korzeniu oraz pędzie roślin hodowanych przy 0,25 i 5 μM Cd, przy niezmienniej biomasie
 - obniżenie poziomu tolerancji na Zn przy ekspozycji na 100 i 200 μM Zn, pomimo że stężenie Zn w pędach było takie samo u roślin transgenicznych jak typu dzikiego,
 - wzrost poziomu tolerancji na Cd u roślin hodowanych w 5 μM Cd.

- b) wyniki wskazujące na zmianę pobierania i tolerancji na Zn i Cd na skutek **ekspresji *AtHMA4-T*** w mniejszym stopniu niż u transformantów *AtHMA4-F*, co sugeruje, że białko pozbawione końca C ma niższą aktywność w komórkach roślinnych niż białko o pełnej długości.
- c) wyniki wskazujące, że **ekspresja *AtHMA4-C*** kodującego koniec C białka AtHMA4 prowadzi do indukcji pobierania i translokacji do pędu Zn i Cd u roślin tytoniu, gdyż stwierdzono:
- wzrost akumulacji Zn lub Cd (w różnym stopniu w zależności od warunków hodowli),
 - obniżenie poziomu tolerancji na Zn i Cd,
 - objawy toksyczności Zn w postaci nekroz zdecydowanie różniły się od tych, które obserwowano u roślin typu dzikiego lub z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-T*.

4.4. Analiza poziomu akumulacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym, komórkowym (apoplast/symplast) oraz w organach u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i *AtHMA4-C*.

Przedstawione w rozdziale 4.3 wyniki badań wskazują na zahamowanie pobierania Zn lub/i Cd u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* poddanemu ekspozycji na 100 μ M Zn (Fig. 10) oraz na 0,25 i 5 μ M Cd (Fig. 12 i 14) w porównaniu do roślin typu dzikiego. Białko AtHMA4-F nie bierze udziału w pobieraniu pierwiastków (odpowiada za eksport Zn bądź Cd poza komórkę), zatem obserwowane zmiany muszą wynikać z indukcji endogennego systemu pobierania metali przez tytoń.

Dodatkowo należy zwrócić uwagę, że w porównaniu do roślin typu dzikiego, u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na 100 μ M Zn występują objawy toksyczności Zn w postaci licznych nekroz, chociaż stężenie Zn w pędach roślin transformowanych i typu dzikiego pozostaje na tym samym poziomie. Jedną z przyczyn obniżonego poziomu tolerancji na Zn może być zmiana równowagi w stężeniu jonów pomiędzy apoplastem a symplastem spowodowana aktywnością AtHMA4-F (przenoszenie Zn i Cd do apoplastu).

Na podstawie literatury i przedstawionych w tej pracy wyników można wywnioskować, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu może prowadzić do zmiany dystrybucji pierwiastków pomiędzy:

- (1) kompartmentami komórkowymi (poziom subkomórkowy),
- (2) symplastem a apoplastem (poziom komórkowy),
- (3) komórkami wchodzącymi w skład tkanek (poziom tkankowy).

Aby zweryfikować postawioną hipotezę zaplanowano badania lokalizacji oraz porównania poziomu stężeń Zn i Cd na poziomie **subkomórkowym** wykorzystując metodę mikroanalizy rentgenowskiej.

4.4.1. Lokalizacja Zn i Cd na poziomie subkomórkowym – mikroanaliza rentgenowska EDX (Energy Dispersive X-ray microanalysis)

Celem przeprowadzonych badań było określenie lokalizacji Zn oraz Cd i porównanie ilościowe tych metali w tkankach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego hodowanych w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn), w obecności 100 μM Zn oraz 5 μM Cd. Wcześniejsze badania wykazały u roślin transgeniczných obniżone pobieranie Zn (przy 100 μM Zn w pożywce), a także Zn i Cd (w obecności 5 μM Cd). W wyniku ekspresji transgeny następowały także zmiany w poziomie tolerancji na Zn lub Cd (rozdział 4.3).

Do analizy lokalizacji Zn i Cd na poziomie subkomórkowym zaplanowano wykorzystanie mikroanalizy rentgenowskiej (EDX). Jest to jedna z metod mikroskopii elektronowej. Kluczowym etapem badań lokalizacji pierwiastków metodą EDX warunkującym powodzenie analizy jest utrwalanie próbek w sposób, który zachowuje natywne rozmieszczenie metali. Do najpowszechniej używanych technik utrwalania należą metody chemiczne, w tym z użyciem glutaraldehydu. Niestety, utrwalanie z wykorzystaniem metod chemicznych może prowadzić do zmiany lokalizacji oraz wypłukania pierwiastków, a w rezultacie strat w poziomie Zn aż do 78% (Davies i inni, 1991). Dla celów analizy lokalizacji pierwiastków na poziomie subkomórkowym bardziej odpowiednie jest fizyczne utrwalanie preparatów poprzez szybkie zamrożenie w ciekłym azocie. Trudność w stosowaniu technik mrozeniowych wynika z powstawania lodu krystalicznego, który niszczy struktury subkomórkowe. Dodatkowo, w trakcie jego powstawania następuje „przyciąganie” wody, prowadzące do przemieszczania się i zmiany lokalizacji metali, w tym Zn^{2+} i Cd^{2+} . Te niekorzystne zmiany można zredukować poprzez zastosowanie techniki zamrażania pod wysokim ciśnieniem (high pressure freezing) i odwadniania przy niskiej temperaturze (freeze substitution). Prawidłowe przeprowadzenie obydwu procedur powinno umożliwić zamarzanie wody z powstawaniem lodu amorficznego, a następnie usunięcie wody i utrwalenie preparatu acetonem, dzięki czemu nie następuje niszczenie struktur subkomórkowych, a wymywanie pierwiastków bywa ograniczone. Takie podejście daje szansę na zbadanie na poziomie subkomórkowym lokalizacji Zn i Cd zbliżonej do tej w żywych komórkach. Metodę tę stosowano np. w badaniach, których celem była analiza subkomórkowej lokalizacji Cd w korzeniach i pędach *A. thaliana* (van Bellegheem i inni, 2007).

W niniejszych badaniach do lokalizacji Zn i Cd metodą EDX zastosowano utrwalanie preparatów przy użyciu techniki zamrażania pod wysokim ciśnieniem i odwadniania przy niskiej temperaturze. Otrzymane preparaty wykazywały dobrą jakość (integralność i widoczność struktur

komórkowych) z nielicznymi artefaktami sugerującymi powstawanie lodu krystalicznego. Możliwość wykrycia pierwiastków w obrębie preparatu była (od strony technicznej) zależna od:

- a) używanej aparatury do detekcji EDX. Do przeprowadzenia analiz na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej zastosowano aparat firmy Oxford z możliwością wykrywania pierwiastków będących w ilości powyżej 0,05 % suchej masy (komunikacja personalna).
- b) ilości pierwiastków w badanych kompartmentach/komórkach/tkankach. Na podstawie badań akumulacji Zn i Cd w obrębie korzeni i liści wyliczono, że przewidywana ilość zakumulowanego Zn po hodowli w obecności 100 μM Zn stanowi w korzeniach 0,6 - 0,7% suchej masy, a w liściach 0,15 – 0,2% suchej masy. Z kolei w przypadku hodowli w obecności 5 μM Cd, udział Cd w całkowitej suchej masie korzeni wynosi 0,05-0,12% natomiast dla liści jest to 0,05 – 0,07%.

Takie przewidywania wskazywały, że badane preparaty przekrojów poprzecznych korzeni i liści roślin poddanych ekspozycji na 100 μM Zn i 5 μM Cd znajdują się w potencjalnym zasięgu detekcji używanego sprzętu EDX (Oxford).

Niestety nie stwierdzono obecności Zn i Cd na przekrojach otrzymanych z liści badanych roślin hodowanych w pożywce z dodatkiem 100 μM Zn, jak i również preparatach (różnych tkanek i komórek) otrzymanych z korzeni i liści roślin hodowanych w obecności 5 μM Cd. Prawdopodobnie stężenie Zn bądź Cd w tych tkankach było poniżej poziomu detekcji. Nie można wykluczyć, iż jednym z powodów było wypłukanie części pierwiastków podczas procedury odwadniania preparatów. Dla porównania, zastosowanie tej metody do analizy poziomu pierwiastków komórkowych zakończyło się powodzeniem (Belleghem i inni, 2007). Badanie w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonywano tymi samymi metodami w tym samym laboratorium (Uniwersytet w Gandawie) pod nadzorem autorów powyższej publikacji.

Zastosowanie mikroanalizy rentgenowskiej umożliwiło jedynie detekcję Zn obecnego w złogach. Jego obecność wykazano w korzeniach roślin poddanych ekspozycji na 100 μM Zn. Złogi miały charakter słabo rozpuszczalnych, na co wskazywała dominacja fosforu (P) oraz obecność Fe, Ca, S. Złogi te obecne były w epidermie i pierwszej warstwie kory pierwotnej korzeni badanych roślin, natomiast w dalszych częściach tkanek pojawiały się one sporadycznie, co uniemożliwiło zbadanie zależności pomiędzy ich ilością oraz lokalizacją Zn (Fig. 32 a i b).

Złogi obecne w obrębie epidermy i pierwszej warstwy kory zawierały Zn w stężeniu powyżej granicy detekcji metody EDX, a ilościowe porównanie wskazywało na podobny poziom Zn w złogach u roślin transformowanych jak i typu dzikiego (Fig. 32). Wykryto także liczne złogi nie zawierające Zn a zawierające P, Fe, Ca i S. Porównując lokalizację złogów zawierających oraz nie zawierających Zn, pomiędzy roślinami transformowanymi a typu dzikiego okazało się, że metal ten występował regularnie w złogach w ścianie komórkowej pomiędzy epidermą, a korą pierwotną

u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (Fig 32. b3-b5), natomiast u roślin typu dzikiego złogi nie zawierały Zn (Fig. 32 a3-a5). Nie stwierdzono obecności Zn w złogach wewnątrz komórek epidermy czy kory pierwotnej u roślin transformowanych (Fig 32. b1 i b2), był on jednak obecny w złogach u roślin typu dzikiego (Fig. 32 a1 i a2). Otrzymany wzór lokalizacji złogów i obecności w nich Zn może wynikać z przeładowania apoplastu cynkiem u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*. Pozostaje wątpliwość czy przeładowanie apoplastu cynkiem występuje jedynie w epidermie i w pierwszej warstwie kory? Wydaje się, że najprawdopodobniej stężenie Zn jest poniżej progu detekcji EDX w pozostałych tkankach korzeni. Dodatkowo badania metodą EDX nie umożliwiły detekcji Zn w liściach badanych roślin. Potrzebne było zastosowanie innych metod detekcji Zn.

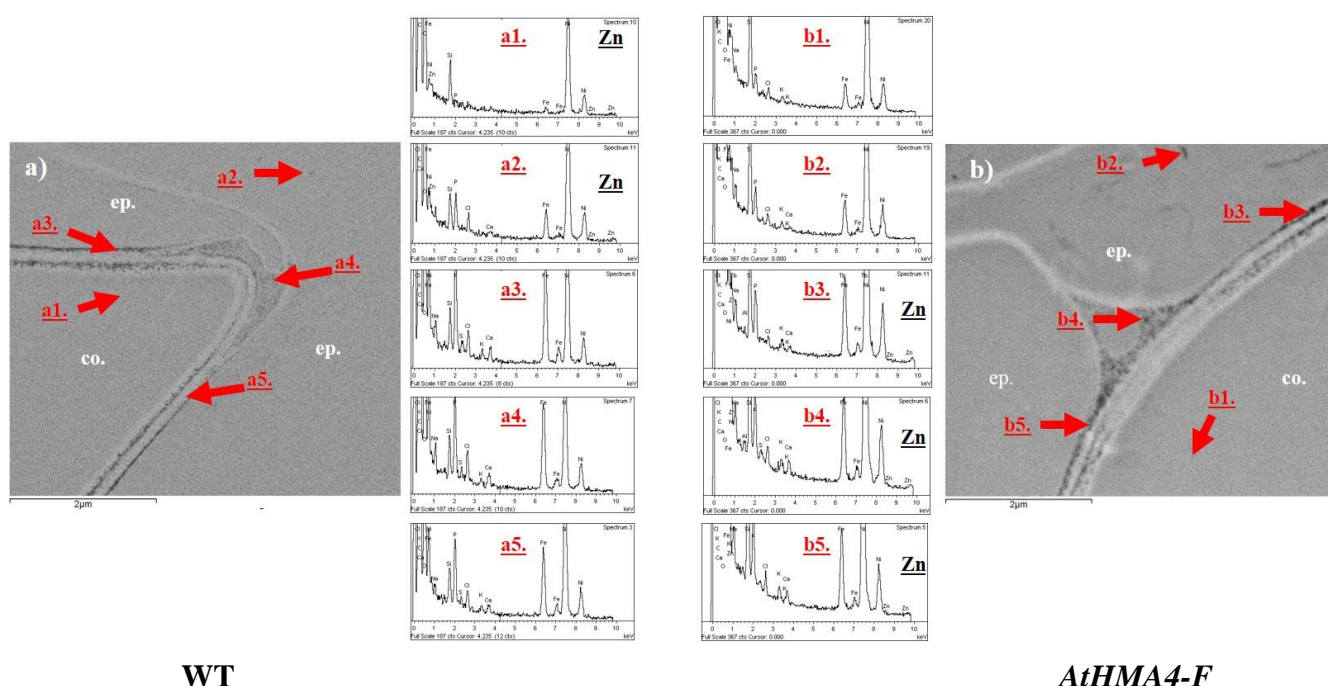


Fig. 32. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego (a i b) oraz elektrogramy (a1-a5; b1-b5). Pokazano reprezentatywne wyniki dla obszaru granicy epidermy i kory pierwotnej. Czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsca analizy pierwiastkowej EDX. Na elektrogramach zaznaczono obecność Zn symbolem tego pierwiastka.

4.4.2. Analiza stężenia Zn w symplaście i apoplaście tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego

Zastosowanie metody mikroanalizy rentgenowskiej sugeruje, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w epidermie oraz w pierwszej warstwie kory pierwotnej może dochodzić do zwiększenia stężenia Zn w apoplaście i zmniejszenia w symplaście. Nie udało się jednak określić lokalizacji oraz poziomu stężenia Zn na poziomie subkomórkowym w pozostałych tkankach korzenia oraz w liściach. Wiadomo, że *AtHMA4-F* odpowiada za eksport Zn z komórki. Ekspresja *AtHMA4-F* jest pod kontrolą konstytutywnego promotora CaMV 35S, zachodzi więc we wszystkich tkankach korzeni i liści. W związku z tym można przypuszczać, że obniżenie stężenia Zn

w symplacie i przeładowanie apoplastu tym metalem może zachodzić we wszystkich komórkach i tkankach roślin transformowanych. Zmiana stosunku stężeń Zn pomiędzy symplastem a apoplastem spowodowana aktywnością *AtHMA4-F* może prowadzić u roślin transformowanych do uruchomienia endogennych mechanizmów przywracających homeostazę Zn, które warunkują powstanie fenotypu transformantów, w tym obniżenia pobierania Zn i obniżenia tolerancji na ten metal.

W dalszej części pracy postanowiono wyjaśnić, czy ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do zmiany stężenia Zn w apoplaście i symplacie. Eksperymenty wykonano na roślinach rosnących w obecności 100 μM Zn (we wcześniejszych badaniach obserwowano obniżenie pobierania Zn i spadek poziomu tolerancji na Zn) oraz 0,5 μM Zn (warunki kontrolne) w porównaniu do roślin typu dzikiego. Przeprowadzono badania mogące wskazać różnice w stężeniu Zn na poziomie:

- **komórkowym** (rozdział 4.4.2. i 4.4.3.) - badano lokalizację i wykonano analizy poziomu stężenia:

- i. **Zn** w symplacie metodą z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 i mikroskopii konfokalnej
- ii. **Zn** w symplacie metodą ICP-MS w wyizolowanych protoplastach liściowych
- iii. **Zn** w apoplaście metodą ICP-MS w płynie apoplastycznym wyizolowanym metodą infiltracji i wirowania.

- **tkankowym** (rozdział 4.4.3.) - badano lokalizację i poziomy stężenia Zn w korzeniach i liściach metodą z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1.

Doświadczenia opisane w tym rozdziale zostały przeprowadzone na roślinach hodowanych w obecności 100 μM Zn, przez 2 dni (a nie przez 6 dni jak w doświadczeniach opisanych w rozdziale 4.2.). Czas ekspozycji roślin na Zn wyznaczono biorąc pod uwagę to, że 2-go dnia u roślin transgeniczných zaczynają pojawiać się nekrozy. Jest to pierwsza zmiana różnicująca transformanty od roślin typu dzikiego (u których w tych warunkach nie obserwujemy nekroz). Doświadczenia przeprowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na Fig. 5 a i b.

4.4.2.1. Porównanie poziomu stężenia Zn w protoplastach korzeniowych (symplast) izolowanych z tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego – metoda z użyciem Zinpyr-1

Aby ocenić różnice w poziomie stężenia Zn w komórkach można użyć specyficznego dla Zn barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 (Sinclair i inni, 2007). Analiza poziomu stężenia Zn w izolowanych protoplastach miała na celu otrzymanie odpowiedzi na pytanie: czy obecność transgeny prowadzi do zmiany stężenia Zn w symplacie roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego.

Protoplasty izolowano z korzeni roślin hodowanych przez 6 tygodni w warunkach kontrolnych. Stężenie Zn oceniano w protoplastach, które po izolacji poddano ekspozycji na 100 μM Zn przez 30 min. Intensywność świecenia barwnika Zinpyr-1 jest wprost proporcjonalna do ilości Zn. Nie zaobserwowano świecenia kompleksu Zinpyr-1 z Zn w obrębie protoplastów inkubowanych w roztworze kontrolnym bez Zn (przy ustawieniach mikroskopu takich jak do analizy protoplastów inkubowanych w obecności 100 μM Zn) (Fig. 33 c), co wskazuje na wielokrotnie niższe stężenie Zn w protoplastach kontrolnych.

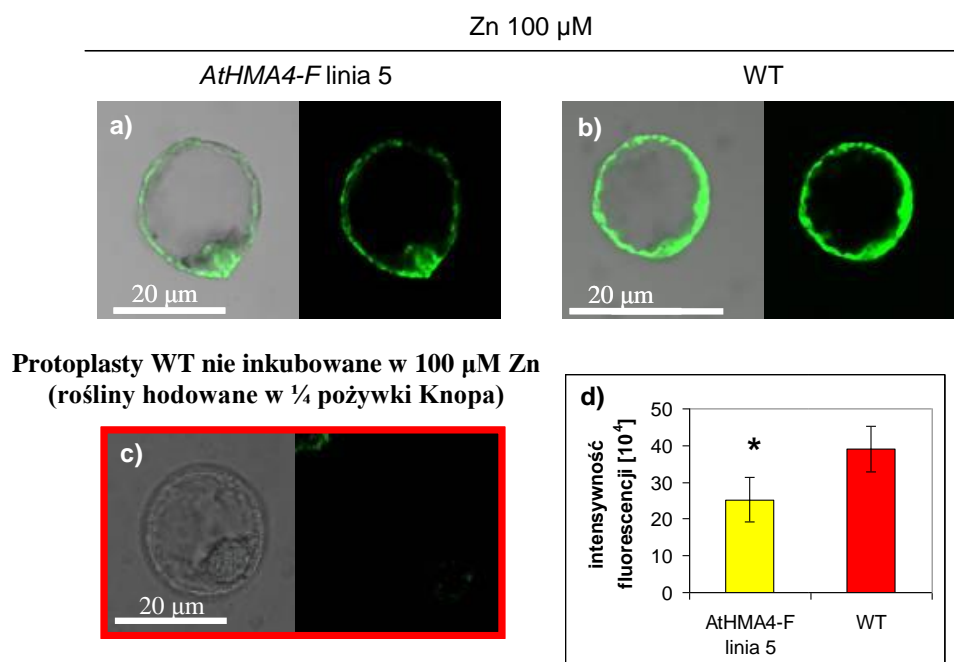


Fig. 33. Analiza poziomu akumulacji Zn w izolowanych (z 6 tygodniowych roślin rosnących w warunkach kontrolnych) protoplastach korzeniowych poddanych ekspozycji na 100 μM Zn przez 30 min. Do izolacji wykorzystano metodę trawienia ścian komórkowych oraz uwalniania protoplastów pod wpływem ciśnienia osmotycznego. a) fluorescencja Zinpyr-1+Zn w reprezentatywnym protoplaście izolowanym z roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linia 5, b) fluorescencja Zinpyr-1+Zn w reprezentatywnym protoplaście izolowanym z roślin typu dzikiego (WT), c) fluorescencja protoplastów inkubowanych bez Zn na przykładzie protoplastu wyizolowanego z roślin typu dzikiego hodowanych w warunkach kontrolnych, d) wykres przedstawiający różnice w intensywności fluorescencji Zinpyr-1+Zn obliczonej przy użyciu programu NIS ELEMENTS, analiza intensywności fluorescencji została przeprowadzona dla min. 30 losowych protoplastów, analizę wykonano 2 krotnie przy 2 niezależnych izolacjach protoplastów. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Badania wskazują na niższy poziom Zn w protoplastach izolowanych z roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do protoplastów pochodzących z roślin typu dzikiego (Fig. 33 a, d). Na przedstawionych fotografiach (Fig. 33) Zn nie jest wykrywany przy użyciu Zinpyr-1 w centralnej części komórki, która jest prawdopodobnie zajmowana przez wakuolę. Może to wskazywać na niższe stężenie Zn w tym kompartmentcie mogące wynikać z krótkiego czasu ekspozycji protoplastów na 100 μM Zn (nie obserwowano żadnego świecenia w protoplastach inkubowanych w warunkach kontrolnych, Fig. 33 c).

4.4.2.2. Poziom stężenia Zn w protoplastach liściowych tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego

W kolejnym etapie, aby potwierdzić otrzymane wyniki badań z wykorzystaniem Zinpyr-1, zastosowano metodę ICP-MS do analizy stężenia Zn w protoplastach izolowanych z liści roślin z ekspresją *AtHMA4-F* oraz typu dzikiego hodowanych 2 dni w 100 μM Zn, a także w warunkach kontrolnych (schemat hodowli jak Fig. 5 a i b).

Stężenie Zn w protoplastach izolowanych z liści tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* linii 5 i 9 hodowanych na pożywce $\frac{1}{4}$ stężenia Knopa nie różniło się od stężenia Zn w protoplastach izolowanych z roślin typu dzikiego (Fig. 34 a). Natomiast w protoplastach izolowanych z roślin transgenicznych poddanych ekspozycji na 100 μM Zn przez 2 dni stężenie Zn było 3-4 krotnie niższe niż w protoplastach izolowanych z roślin typu dzikiego (Fig. 34 b).

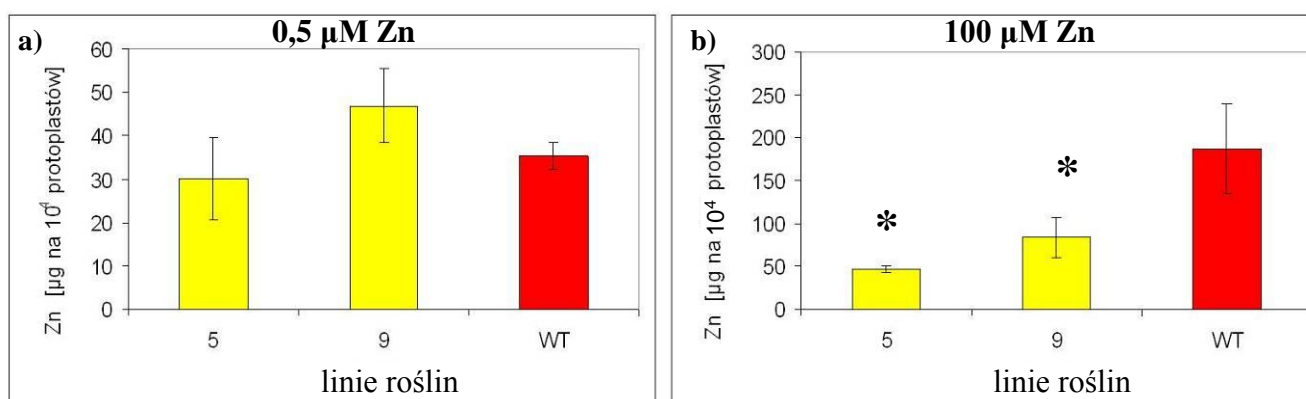


Fig. 34. Stężenie Zn w protoplastach izolowanych z liści 6 tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linii 5 i 9 oraz roślin typu dzikiego WT, hodowanych na pożywce $\frac{1}{4}$ stężenia pożywki Knopa (a – 0,5 μM Zn) i takiej samej pożywce, ale dodatkowo z 100 μM Zn przez 2 dni (b). Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Przeprowadzone badania pokazały, że ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do obniżenia stężenia Zn w symplasmie tylko u roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn. Należy zwrócić uwagę, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w warunkach kontrolnych, ilość Zn w protoplastach jest na poziomie 30-50 μg na 10^4 protoplastów, natomiast u roślin poddanych ekspozycji na 100 μM Zn na niewiele wyższym poziomie, bo ok. 40-70 μg na 10^4 protoplastów. U roślin typu dzikiego różnica pomiędzy ilością Zn w protoplastach pochodzących z roślin hodowanych w warunkach kontrolnych, a tymi, które zostały poddane ekspozycji na 100 μM Zn jest ok. 5-krotna (40 do 200 μg na 10^4 protoplastów Fig. 34). Możliwe więc, że u roślin transgenicznych hodowanych w warunkach kontrolnych uruchamiane są mechanizmy homeostazy Zn prowadzące do utrzymania poziomu Zn w symplasmie krytycznego dla metabolizmu, pomimo ciągłego eksportu Zn w wyniku aktywności *AtHMA4-F*. Gdy rośliny hodowane są w warunkach nadmiaru Zn (100 μM) u roślin typu dzikiego może następować akumulacja tego pierwiastka wewnątrz komórek, natomiast u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* następuje eksport nadmiaru Zn do apoplastu.

4.4.2.3. Analiza stężenia Zn w apopląście tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego - metoda infiltracji i wirowania

W dwóch poprzednich rozdziałach (4.4.2.2. i 4.4.2.1.) wskazano, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* następuje obniżenie poziomu Zn w sympląście, co może być związane z usuwaniem tego metalu z symplastu w wyniku aktywności białka kodowanego przez transgen. Jeżeli tak jest, to obniżeniu poziomu Zn w sympląście powinno towarzyszyć podwyższenie poziomu Zn w apopląście w tkankach. W celu określenia czy ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do przeładowania apoplastu cynkiem, wykonano izolację płynu apoplastycznego z liści badanych roślin metodą infiltracji i wirowania (Dannel i inni, 1995; López-Millán i inni 2004). Do doświadczeń użyto 6-tygodniowych roślin rosnących w warunkach kontrolnych, jak i poddanych ekspozycji na 100 μM (2 dni) (Fig. 5 b). W otrzymanych próbkach określono stężenie Zn i Cd a także K, jako kontrola czystości płynu apoplastycznego od zawartości symplastu (Cosio i inni, 2005). Stężenie K w apopląście jest średnio 10x mniejsze niż w sympląście, więc ewentualne przerwanie błon podczas procedury izolacji płynu apoplastycznego prowadziłoby do dużego wzrostu stężenia tego pierwiastka w płynie apoplastycznym.

Stężenie Zn w płynie apoplastycznym roślin z ekspresją *AtHMA4-F* jest 2-3 krotnie większe niż u roślin typu dzikiego, zarówno w roślinach hodowanych w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn), jak i przy ekspozycji na 100 μM Zn (Fig. 35 a i c). Nie zaobserwowano natomiast żadnych istotnych różnic w stężeniu K (Fig. 35 b i d). Zgodnie z przypuszczeniami obniżeniu stężenia Zn w sympląście roślin z ekspresją *AtHMA4-F* towarzyszy wzrost stężenia Zn w apopląście.

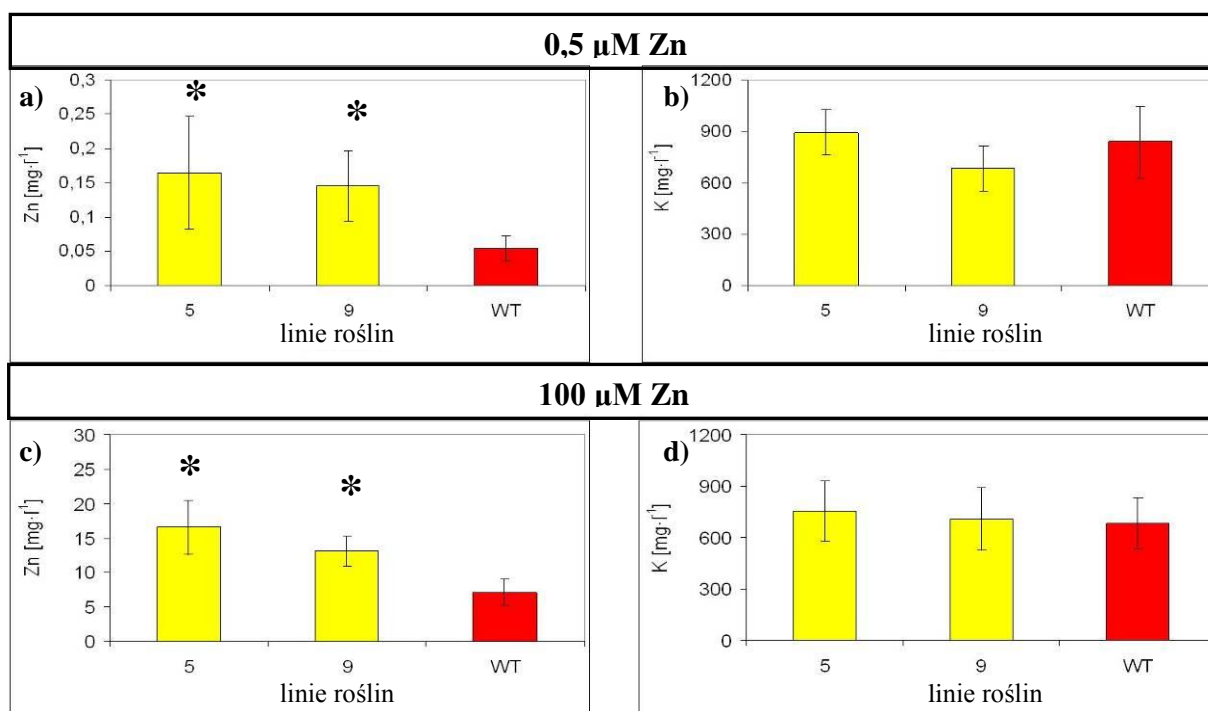


Fig. 35. Stężenia Zn (a i c) i K (b i d) w płynie apoplastycznym wyizolowanym z liści roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linie 5 i 9 oraz roślin typu dzikiego WT, hodowanych na pożywce ¼ stężenia pożywki Knopa (a-b) oraz przy pożywce uzupełnionej 100 μM Zn (c-d). Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

4.4.3. Analiza lokalizacji Zn w korzeniach i liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* oraz na poziomie komórkowym z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1

W poprzednim rozdziale (4.4.2.) wykazano, iż ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do obniżenia poziomu Zn w symplacie i do wzrostu stężenia tego pierwiastka w apoplaście. Powstaje pytanie, czy taka sytuacja będzie prowadzić do zmian w dystrybucji Zn w tkankach roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego. Aby to sprawdzić przeprowadzono analizy względnej ilości oraz lokalizacji Zn na poziomie tkankowym w korzeniach i liściach badanych roślin metodami mikroskopii konfokalnej z użyciem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1.

4.4.3.1. Analiza ilości oraz lokalizacji Zn w **korzeniach** tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* oraz tytoniu typu dzikiego.

W celu porównania ilości i lokalizacji Zn na poziomie tkankowym i komórkowym wykonano analizy z użyciem Zinpyr-1 korzeni roślin poddanych ekspozycji na 0,5 μM Zn (kontrola) oraz 100 μM Zn przez 2 dni (hodowla roślin zgodnie ze schematem a) i b) Fig. 5. Jednocześnie określono całkowite stężenie Zn (metodą ASA) w korzeniach hodowanych 2 dni (Fig. 36).

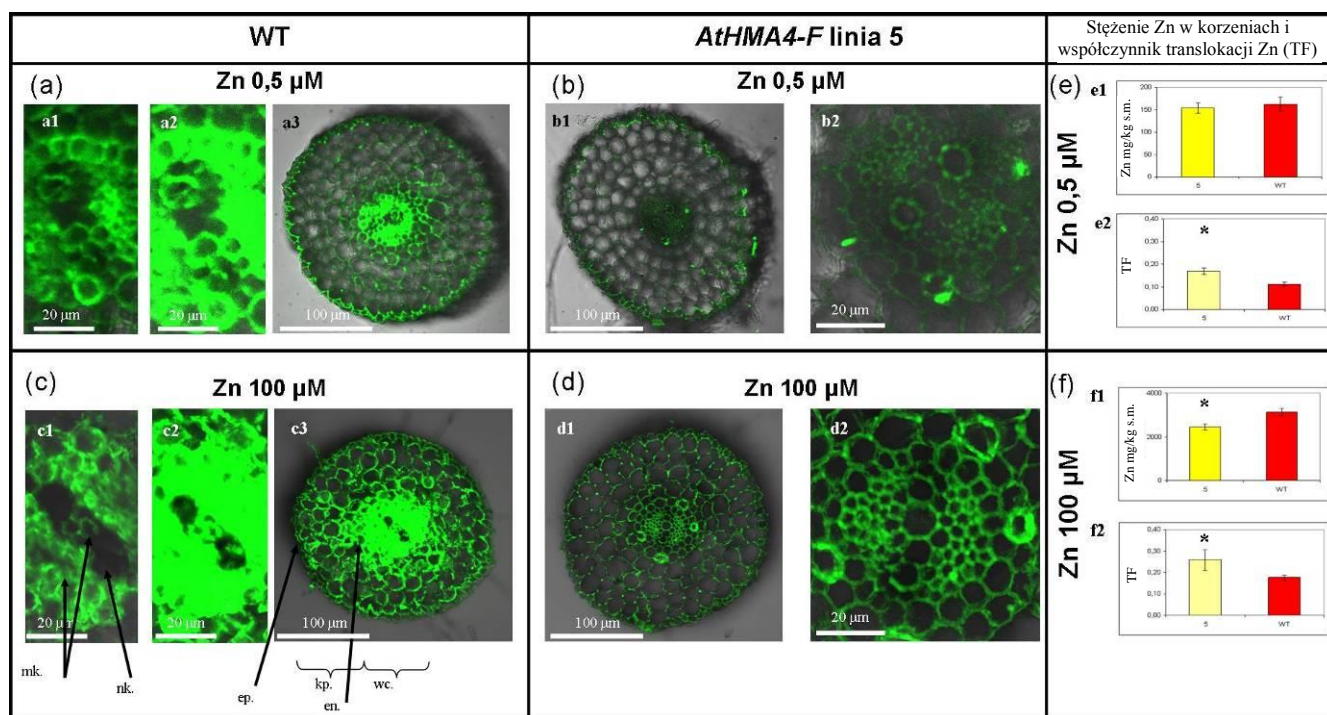


Fig. 36. Lokalizacja Zn z użyciem 10 μ M roztworu Zinpyr-1 w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, linia 5 i roślin typu dzikiego, hodowanych w warunkach kontrolnych (0,5 μ M Zn) (a i b) i poddanych ekspozycji na 100 μ M Zn przez 2 dni (c i d). a1 i c1 – zdjęcia ze zmniejszoną czułością fotopowielacza dla uwidocznienia szczegółów dla roślin typu dzikiego; a2 i c2, b2 i d2 – zbliżenia części środkowej walca osiowego. Skróty: wc. - walec osiowy, kp. – kora pierwotna, en. - endoderma ep. – epiderma, mk. – miękisz ksylemowy, nk. – naczynia ksylemu. Dodatkowo w sekcji bocznej wykresy całkowitego stężenia Zn w korzeniach oraz stosunek stężenia Zn pęd/korzeń dla badanych roślin hodowanych przy 0,5 lub 100 μ M Zn przez 2 dni określony metodą ASA (e i f). Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Wyniki analiz poziomu stężenia Zn u badanych roślin pokazano na Fig. 36. (e1, f1). Stężenie całkowite Zn w całych korzeniach transformantów hodowanych w warunkach 0,5 μ M Zn nie różniło się znacząco od typu dzikiego. Natomiast w obecności 100 μ M Zn stężenie metalu w korzeniach transformantów *AtHMA4-F* było obniżone. Poziom translokacji Zn z korzenia do pędu u roślin transformowanych określony na podstawie współczynnika translokacji (TF) był nieznacznie większy niż u typu dzikiego w każdym z badanych wariantów.

Analiza z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1 pokazała, że intensywność fluorescencji na przekrojach korzeni jest zdecydowanie większa u roślin typu dzikiego niż u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, zarówno w obecności 0,5, jak i 100 μ M Zn. Różnica ta jest szczególnie widoczna w obrębie walca osiowego, gdzie duża intensywność fluorescencji barwnika wskazuje na obecność dużych stężeń Zn (Fig. 36 a, b, c i d). Na przekroju korzenia roślin typu dzikiego intensywność fluorescencji jest na tyle duża, że nie można rozróżnić pojedynczych komórek (Fig. 36. a2-3 i c2-3), natomiast u roślin transformowanych widać je wyraźnie (Fig 36. b1-2 i d1-2). Aby u roślin typu dzikiego można było zaobserwować kontury komórek, należało zmniejszyć ustawienia mikroskopu konfokalnego (Fig. 36, a1 i c1). U roślin typu dzikiego jak i transformantów cynk gromadzony jest preferencyjnie w obrębie walca osiowego, natomiast w mniejszym stopniu w korze pierwotnej i epidermie. Największa różnica pomiędzy roślinami transgenicznymi a typu

dzikiego hodowanymi zarówno w obecności 0,5 i 100 μM Zn, uwidocznia się w lokalizacji Zn w komórkach. Wysoka intensywność fluorescencji w walcu osiowym u roślin typu dzikiego, wskazuje na obecność dużych ilości Zn wewnątrz komórek (Fig. 36 a1 i c1). U tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* świecenie kompleksu Zinpyr-1-Zn pochodzi przede wszystkim z symetrycznych, geometrycznych kształtów konturów komórek (ścian komórkowych, Fig. 36 b2 i d2). Takie wyniki wskazują, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu zarówno u roślin hodowanych przy 0,5 jak i 100 μM Zn prowadzi do wzrostu stężenia Zn w apoplacie. Zaskakująca jest u badanych roślin różnica w ilości Zn w obrębie ścian komórkowych naczyń ksylemu. Okazało się, że gdy rośliny transgeniczne i typu dzikiego hodowane były w obecności 0,5 μM Zn, obserwowano intensywne świecenie ścian komórkowych naczyń ksylemu, które jest porównywalne ze świeceniem Zinpyr 1 w sąsiednich komórkach miękiszu ksylemowego (Fig. 36. a1, b2). Gdy jednak rośliny typu dzikiego poddane były ekspozycji na 100 μM Zn, ściany komórkowe naczyń ksylemu nie wykazywały fluorescencji Zinpyr-1 związanej z obecnością Zn w porównaniu do sąsiadujących komórek (Fig. 36. c1). U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* fluorescencja Zinpyr-1 jest jednakowa, zarówno w obrębie wszystkich ścian komórkowych walca osiowego, jak i kory pierwotnej oraz epidermy.

Otrzymane wyniki wskazują, że w korzeniach tytoniu nietransformowanego duże ilości Zn zlokalizowane są głównie w walcu osiowym, niższe stężenia obserwowano w epidermie i korze pierwotnej. Ekspresja *AtHMA4-F* w znaczący sposób zmienia ten wzór dystrybucji Zn. W komórkach transformantów w porównaniu do typu dzikiego, aktywność *AtHMA4-F* zwiększa eksport Zn poza komórkę i redukuje akumulację w wakuolach miękiszu ksylemowego, prowadząc jednocześnie do przeładowania apoplastu cynkiem.

4.4.3.2. Analiza stężenia Zn w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego hodowanych w warunkach kontrolnych i w obecności 100 μM Zn przez 2 dni.

Ważnym elementem badań poziomu stężenia Zn z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego jest punkt odniesienia (weryfikacja) w postaci analiz całkowitego stężenia Zn w organach badanych roślin wykonanych np. metodą ASA. Wcześniej wykazano, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* obserwujemy obniżenie stężenia Zn w korzeniach oraz brak różnic w stężeniu Zn w pędach u roślin hodowanych przez 6 dni w obecności 100 μM Zn (Fig. 10 g i h). W doświadczeniach opisanych poniżej, tak jak zaznaczono we wstępie do rozdziału 4.4.2., skrócono czas ekspozycji roślin na Zn z 6-ciu do 2-ch dni, przede wszystkim, aby ograniczyć do minimum ilość obszarów nekrotycznych pojawiających się u roślin transformowanych. Wiadomo, że akumulacja Zn w roślinach będzie zależna od fazy rozwojowej i czasu ekspozycji roślin na ten pierwiastek. Aby umożliwić odniesienie otrzymanych wyników do badań z wykorzystaniem

barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1, wykonano dodatkową analizę akumulacji Zn w całym pędzie roślin poddanych krótszemu czasowi ekspozycji na Zn (zgodnie ze schematem z Fig. 5 a i b). W badaniach z użyciem Zinpyr-1 zaplanowano analizy przekrojów poprzecznych blaszki liściowej (rozdział 4.4.3.3), tak więc jako uzupełnienie sprawdzono także, czy występują różnice w akumulacji Zn w mezofilu liści badanych roślin poprzez analizę poziomu stężenia Zn w preparatach jedynie blaszki liściowej bez widocznego unerwienia.

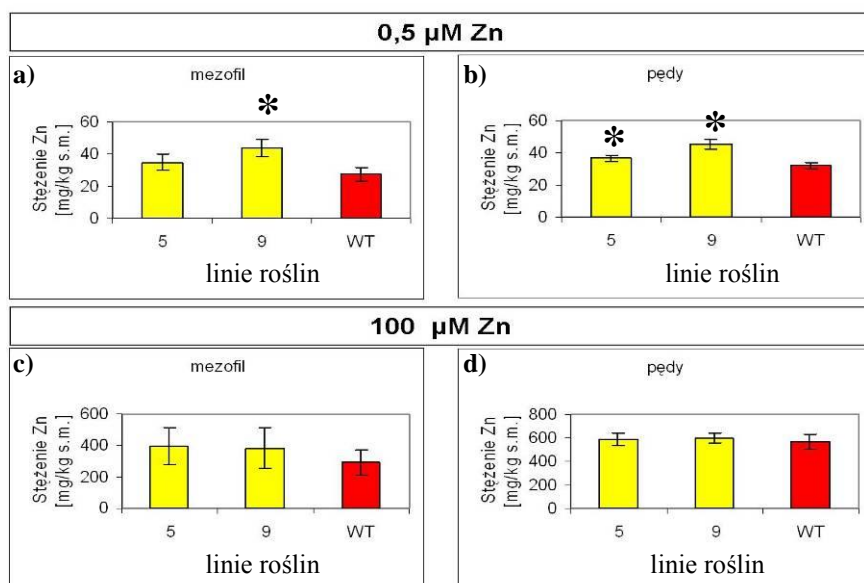


Fig. 37. Stężenie Zn w mezofilu (a-c) i całych pędach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linie 5 i 9) oraz roślin typu dzikiego WT hodowanych w warunkach kontrolnych i poddanych ekspozycji na 100 μM Zn przez 2 dni. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Otrzymane wyniki wskazują, że w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn) rośliny z ekspresją *AtHMA4-F* mają tendencję do zwiększonej akumulacji Zn w pędzie (Fig 37 b). Taki wynik jest odmienny od otrzymanego dla roślin hodowanych o 4 dni dłużej, u których nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy roślinami transgenicznymi a typu dzikiego (Fig. 10 a i b). Możliwe, że obserwowane rozbieżności wynikają z różnic w fazie rozwojowej roślin. Wzrost stężenia Zn w pędzie w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn) u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* częściowo odzwierciedlony jest w próbkach zawierających jedynie mezofil (Fig. 37 a). U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn przez 2 dni stężenie Zn w mezofilu, jak i pędzie jest na poziomie podobnym u roślin typu dzikiego (Fig. 37 c i d). W pędach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych przez 6 dni także nie zaobserwowano różnic w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 10 f). Tytoń transgeniczny hodowany przez krótszy czas w obecności 100 μM Zn nie różni się w poziomie akumulacji Zn od roślin typu dzikiego.

4.4.3.3. Analiza ilości oraz lokalizacji Zn w liściach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*.

Wcześniejsze badania wykazały, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu obniża poziom tolerancji na Zn. U transformantów poddanych ekspozycji na 100 μM Zn nekrozy rozwiąły się już 2-go dnia, czego nie obserwowano u roślin typu dzikiego, chociaż stężenie Zn w liściach (mezofilu

ale także i całych pędach Fig. 37) było takie samo u obu linii roślin. Wiadomo także, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do przeładownia apoplastu Zn i zmniejszenia jego stężenia w symplaście (rozdział 4.4.2). Sprawdzenie czy obserwowane zmiany u roślin transgeniczných wpływają na zmianę lokalizacji Zn w obrębie blaszki liściowej mogłoby pomóc zrozumieć mechanizm związany z obniżeniem poziomu tolerancji u tych roślin. Aby porównać ilość Zn i jego lokalizację, pomiędzy roślinami typu dzikiego i transformowanymi, wykonano badania przekrojów blaszki liściowej roślin poddanych ekspozycji na 0,5 μM (kontrola) oraz 100 μM Zn (hodowanych zgodnie ze schematem a i b z Fig. 5) z użyciem Zinpyr-1.

U roślin typu dzikiego nekrozy obserwujemy dopiero w obecności 200 μM Zn. Aby móc porównać lokalizację Zn w blaszce liściowej roślin transgeniczných (z nekrozami) z blaszką liściową zmienioną w podobny sposób pod wpływem Zn (z obecnością nekroz), porównano lokalizację Zn w liściach transformantów hodowanych w obecności 100 μM Zn z roślinami typu dzikiego poddanymi ekspozycji na 200 μM Zn.

Analiza lokalizacji Zn w liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego, podobnie jak w przypadku korzeni, wskazuje na znaczącą zmianę dystrybucji Zn w obrębie tkanek. U roślin typu dzikiego hodowanych przy 0,5 μM i 100 μM Zn, Zn zlokalizowany jest preferencyjnie w obrębie komórek miękiszu palisadowego (Fig 38. a i c oraz a1 i c1) w całej blaszce liściowej. Inaczej jest u roślin typu dzikiego hodowanych przez 2 dni w obecności 200 μM Zn, u których duże ilości tego pierwiastka zlokalizowane są w obrębie obszarów nekrotycznych, przy czym w komórkach miękiszu palisadowego, które sąsiadują z nekrozami obserwowana fluorescencja Zinpyr-1 z Zn jest mniejsza (Fig. 38 e i e1). U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na kontrolne stężenia Zn w pożywce (0,5 μM), Zn jest zlokalizowany w obrębie ścian komórkowych i przestrzeni międzykomórkowych, zarówno w miękiszu, jak i epidermie. Nie zaobserwowano natomiast akumulacji Zn wewnątrz komórek miękiszu palisadowego. Takie wyniki w porównaniu do akumulacji Zn u roślin typu dzikiego wskazują na obniżenie poziomu stężenia Zn w komórkach miękiszu palisadowego i jego wzrost w apoplaście u roślin transgeniczných.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn pierwiastek ten zlokalizowany jest przede wszystkim w obrębie występujących w tym wypadku obszarów nekrotycznych (Fig. 38 d i d3). W pozostałej części blaszki liściowej transformantów obserwowano obecność Zn w niewielkich ilościach (w porównaniu do roślin typu dzikiego) w niektórych komórkach miękiszu palisadowego (Fig. 38 d1).

Duże różnice w zdolności do akumulacji Zn pomiędzy komórkami wchodzącymi w skład jednorodnej tkanki mezofilu palisadowego można zaobserwować w liściu u roślin transformowanych i typu dzikiego. Wysokie stężenie Zn stwierdzono w obrębie obszarów nekrotycznych zarówno u roślin transgenicznych rosnących w obecności 100 μM Zn, jak i u roślin typu dzikiego hodowanych w 200 μM Zn. Taki wzór lokalizacji Zn wskazuje na istnienie mechanizmu specyficznej dystrybucji tego pierwiastka w blaszce liściowej do pewnych obszarów/komórek mezofilu. Największe zróżnicowanie w akumulacji Zn pomiędzy pojedynczymi komórkami mezofilu obserwowano przy nadmiarze tego pierwiastka w blaszce liściowej. Jeżeli stężenie Zn w obrębie obszarów mezofilu o zwiększonej akumulacji tego pierwiastka przekroczy poziom jego toksyczności dla komórek, następuje ich śmierć i powstają nekrozy.

Warto także zastanowić się, skąd może pochodzić sygnał prowadzący do gromadzenia Zn w wybranych obszarach blaszki liściowej. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn stężenie tego pierwiastka w obrębie blaszki liściowej jest takie samo jak u roślin typu dzikiego (Fig. 37 c), natomiast stężenie Zn w apoplacie jest 2-krotnie wyższe niż u roślin typu dzikiego (Fig. 35 c). Można przypuszczać, że sygnał uruchamiający mechanizm załadunku Zn do komórek akumulujących wysokie stężenia Zn powstaje w wyniku przeładowania apoplastu tym metalem u roślin transgenicznych. Nekrozy obserwowano także u roślin typu dzikiego hodowanych w obecności 200 μM Zn, gdzie stężenie Zn w płynie apoplastycznym wynosiło 17,7 \pm 7,3 mg/kg i było zbliżone do stężenia tego pierwiastka w apoplacie roślin transformowanych rosnących w obecności 100 μM Zn (Fig. 35 c). Otrzymany wynik sugeruje, że przekroczenie pewnego poziomu stężenia Zn w apoplacie może indukować sygnał prowadzący do zmiany w dystrybucji Zn w mezofilu blaszki liściowej. Należy pamiętać, że w większości badań mających na celu ocenę poziomu tolerancji na metale, porównuje się stężenia całkowite pierwiastków w obrębie organów. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na ogromne znaczenie apoplastu w uruchamianiu mechanizmów tolerancji metali, co może w istotny sposób zmieniać kontekst otrzymanych wyników.

W trakcie analizy wyników badań lokalizacji cynku zwrócono uwagę na obecność niskiego poziomu fluorescencji obszarów nekrotycznych na preparatach wykonanych z liści roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn, których nie poddano działaniu Zinpyr-1 (Fig. 38. f). Fluorescencja w tym obszarze może wynikać z autofluorescencji lignin, substancji wchodzących w skład ściany komórkowej, odpowiadających za zmniejszenie ich przepuszczalności dla wody oraz za ich sztywność. Taki wynik może wskazywać na lignifikację ścian komórkowych w trakcie powstawania nekroz. Może mieć to duże znaczenie w ograniczeniu dyfuzji Zn, z obszaru nekrozy do otaczających komórek. Przeprowadzono zatem analizę poziomu lignifikacji ścian komórkowych mezofilu blaszki liściowej u roślin *AtHMA4-F* hodowanych

w 100 μM Zn oraz typu dzikiego w obecności 100 i 200 μM Zn. Stwierdzono obecność z lignifikowanych ścian jedynie w komórkach w obrębie obszarów nekrotycznych zarówno u roślin typu dzikiego, jak i roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (Fig. 39 a1-3 oraz c4-c9).

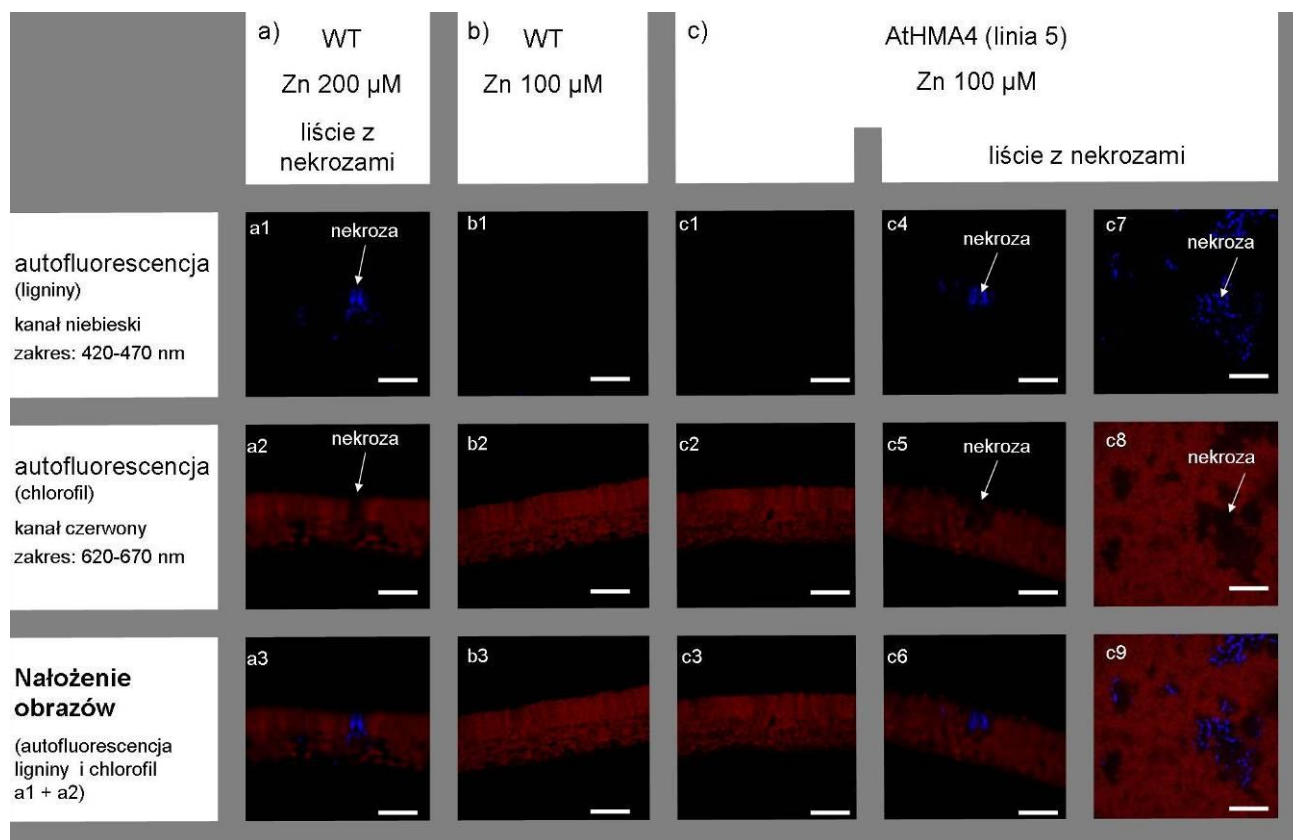


Fig. 39. Autofluorescencja lignin (420 – 470 nm) w liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, (linia nr 5) i roślin typu dzikiego (WT) poddanych ekspozycji na 100 μM Zn przez 2 dni (c i b) oraz rośliny typu dzikiego poddanych ekspozycji na 200 μM Zn przez 2 dni a). Przekroje przez blaszki liściowe (a1-3, b1-3, c1-6), wygląd blaszki liściowej zdjęcie od strony epidermy górnej (c7-9).

4.4.4. Analiza lokalizacji Zn w liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-C*

Pomimo tego, że stężenie Zn w pędach u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* hodowanych w obecności 100 μM Zn jest na podobnym poziomie jak u roślin typu dzikiego, u roślin transformowanych nastąpiło obniżenie poziomu tolerancji na Zn, na co wskazuje nasilenie objawów jego toksyczności w postaci nekroz. Dodatkowo, co jest szczególnie ciekawe, u roślin z ekspresją *AtHMA4-C*, nekrozy są duże i lokalizują się na lub w bezpośrednim otoczeniu unerwienia blaszki liściowej (Fig. 29 i 30). Tymczasem u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych przy 100 μM Zn i roślin typu dzikiego hodowanych w pożywce zawierającej 200 μM Zn nekrozy są drobne i rozmieszczone na całej powierzchni blaszki liściowej (Fig. 29).

AtHMA4-C jest wyrażane w tytoniu pod konstytutywnym promotorem CaMV35S, zatem jego ekspresja zachodzi we wszystkich komórkach transformanta. Kodowane białko wiąże jony Zn

poprzez reszty cystein i histydyn, co może redukować jego dostępność dla metabolizmu. Wiązanie Zn w cytoplazmie z białkiem AtHMA4-C może prowadzić do ograniczenia translokacji Zn w komórkach oraz tkankach i co za tym idzie, także zmiany jego dystrybucji w roślinie. Aby sprawdzić lokalizację Zn na poziomie tkankowym wykonano barwienia przekrojów liści roślin hodowanych zgodnie ze schematem a) i b) z Fig. 5 poddanych ekspozycji na 0,5 μM lub 100 μM Zn.

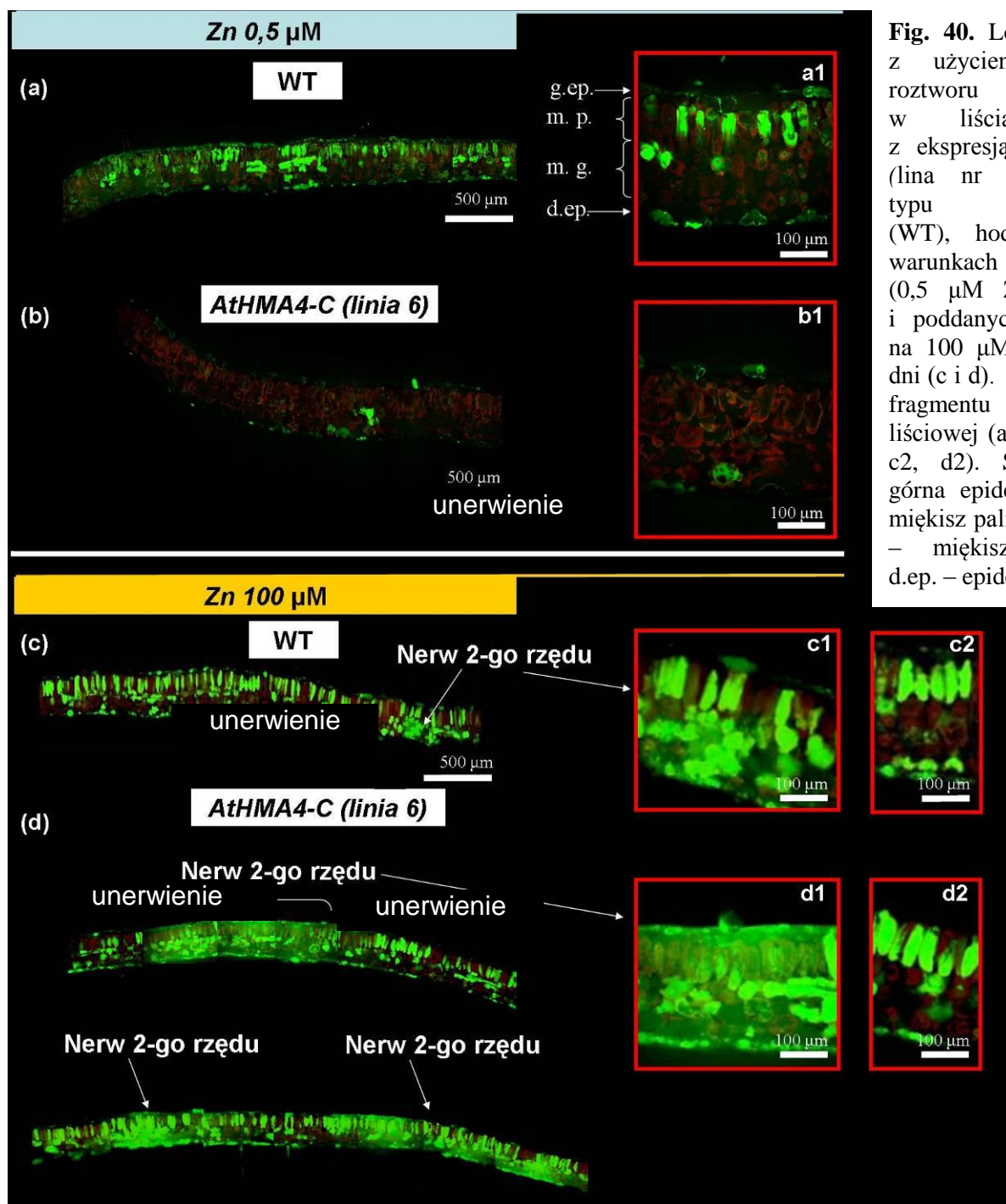


Fig. 40. Lokalizacja Zn z użyciem 10 μM roztworu Zinpyr-1 w liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-C*, (linia nr 6) i roślin typu dzikiego (WT), hodowanych w warunkach kontrolnych (0,5 μM Zn) (a i b) i poddanych ekspozycji na 100 μM Zn przez 2 dni (c i d). Powiększenia fragmentu blaszki liściowej (a1, b1, c1, d1, c2, d2). Skróty: g.ep. – górna epiderma, m.p. – mięksisz palisadowy, m.g. – mięksisz gąbczasty, d.ep. – epiderma dolna

U roślin z ekspresją *AtHMA4-C* wykazano istotną różnicę w dystrybucji Zn w obrębie tkanek liści w stosunku do roślin typu dzikiego, która zależy od stężenia tego metalu w pożywce.

U transformantów poddanych ekspozycji na 0,5 μM Zn obserwujemy wyraźne zmniejszenie sygnału pochodzącego od kompleksu barwnika fluorescencyjnego Zinpyr-1-Zn, w stosunku do blaszki liściowej roślin typu dzikiego (Fig. 40 a i b). Zupełnie inny obraz obserwujemy u roślin poddanych ekspozycji na 100 μM Zn; u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* następuje wyraźny wzrost poziomu fluorescencji Zinpyr-1-Zn w obszarach zlokalizowanych przy unerwieniu (wiązkach przewodzących) blaszki liściowej w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 40 c i c1 oraz d i d1). W obszarach przy wiązkach przewodzących w liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-C* fluorescencja jest zlokalizowana w obrębie całego przekroju w komórkach i w przestrzeniach międzykomórkowych. Możliwe, że u roślin transgeniczných Zn jest obecny w bardzo dużych ilościach w wiązce przewodzącej oraz w towarzyszących komórkach. Wydaje się, iż obecność dużych ilości Zn w tych miejscach jest przyczyną rozwoju obszarów nekrotycznych. Pozostałe obszary blaszki liściowej roślin transformowanych nie różnią się od analogicznych części tkanek roślin typu dzikiego (Fig. 40 c2 i d2). U roślin typu dzikiego sygnał pochodzący od kompleksów Zinpyr-1-Zn jest nieznacznie podwyższony w unerwieniu, tym niemniej sąsiadujące komórki nie różnią się w znaczący sposób od reszty tkanki (Fig. 40 c i c1).

4.5. Analiza zmian w ekspresji genów oraz procesach metabolicznych w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* poddanemu ekspozycji na 0,25 μM stężenie Cd

Z literatury wiadomo, że substratem dla *AtHMA4-F* są jony Zn oraz Cd (Mills i inni, 2003; 2005; Williams i Mills, 2004; Verret i inni, 2004; Beakerad i inni, 2010). U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 0,25 μM Cd w pożywce, obserwujemy ograniczenie pobierania Cd i Zn (rozdział 4.3.1.1.). *AtHMA4-F* odpowiada za eksport Zn i Cd do apoplastu. Wykazano, że u roślin tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* dochodzi do zaburzenia równowagi w stężeniu Zn pomiędzy apoplastem i symplastem, a w konsekwencji do zmiany dystrybucji Zn w tkankach (rozdział 4.4.3). Zmiany w stężeniu Zn w apoplaście i symplacie komórek transformantów mogą prowadzić do uruchomienia mechanizmów homeostazy przywracających prawidłowe stężenie tego metalu. Bardzo ważnym etapem regulacji homeostazy metali oraz odpowiedzi na obecność pierwiastków toksycznych takich jak Cd jest zmiana ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy komórkowe związane z pobieraniem i sekwestracją metali. W związku z tym zmiany poziomu ekspresji genów u roślin transgeniczných w porównaniu do roślin typu dzikiego mogą wskazać, jakie mechanizmy molekularne zostały uruchomione u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, prowadząc do obniżonego pobierania Zn i Cd. Znając potencjalne mechanizmy prowadzące do ograniczenia pobierania Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* na poziomie molekularnym, należy w dalszej kolejności określić, czy obserwujemy ich

odzwierciedlenie na poziomie metabolizmu komórki/tkanki. Celem kolejnego etapu badań wykonywanych w ramach pracy doktorskiej było określenie, czy ekspresja *AtHMA4-F* u roślin hodowanych w warunkach ekspozycji na 0,25 μM Cd prowadzi do zmiany (w porównaniu do roślin typu dzikiego):

- 1) stężenia Zn i Cd w apoplaście i symplaście wykorzystując rozszerzoną metodę infiltracji i wirowania,
- 2) poziomu ekspresji genów endogennych w korzeniach badanych roślin przeprowadzając analizę z wykorzystaniem mikromacierzy tytoniowych,
- 3) zmian na poziomie metabolicznym wynikających z działania mechanizmów wytypowanych na podstawie badań na poziomie molekularnym.

4.5.1. Określenie stężenia Zn i Cd w apoplaście i sympleście tytoniu typu dzikiego oraz z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd

W pierwszym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* obserwujemy zmianę poziomu stężenia Zn lub Zn i Cd pomiędzy symplastem a apoplastem roślin hodowanych w obecności Cd. W tym celu wykonano analizy stężenia Zn i Cd w płynie apoplastycznym izolowanym z liści badanych roślin. Wskazaniem byłoby wyizolowanie płynu apoplastycznego z korzeni. W ramach metod używanych do realizacji celów pracy doktorskiej nie było jednak możliwości izolacji takiej ilości płynu apoplastycznego z korzeni, aby można było wykonać pomiary. Ilość płynu apoplastycznego w liściach jest większa niż w korzeniach, co wynika z występowania w nich większych przestworów międzykomórkowych. Postanowiono wykorzystać wariant metody izolacji płynu apoplastycznego poprzez infiltrację i wirowanie umożliwiającą określenie poziomu Zn i Cd w sympleście. Zgodnie z metodą infiltracji i wirowania opracowaną przez Mühling K. H. i Läuchli A. (2003), płyn apoplastyczny otrzymuje się poprzez infiltrację tkanek liści wodą i odwirowanie wody z płynem apoplastycznym w niej rozcieńczonym. W tkance otrzymanej po izolacji płynu apoplastycznego pozostaje symplast oraz ściany z resztkami rozcieńczonego płynu apoplastycznego. W otrzymanym tą metodą płynie apoplastycznym wykonano analizę stężenia Zn i Cd oraz K (jako kontrola integralności tkanek). Izolację przeprowadzono na liściach 6-cio tygodniowych roślin poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd (4 dni) (Fig. 4 a). W kolejnym kroku niszczy się błony komórkowe poprzez gwałtowne zamrożenie w ciekłym azocie i rozmrożenie pozostałości tkanki i zwirowanie materiału, aby oddzielić część płynną zawierającą symplast od pozostałości (części stałych) reprezentujących ściany komórkowe. Następnie, w otrzymanym płynie symplastycznym, określono stężenie badanych metali.

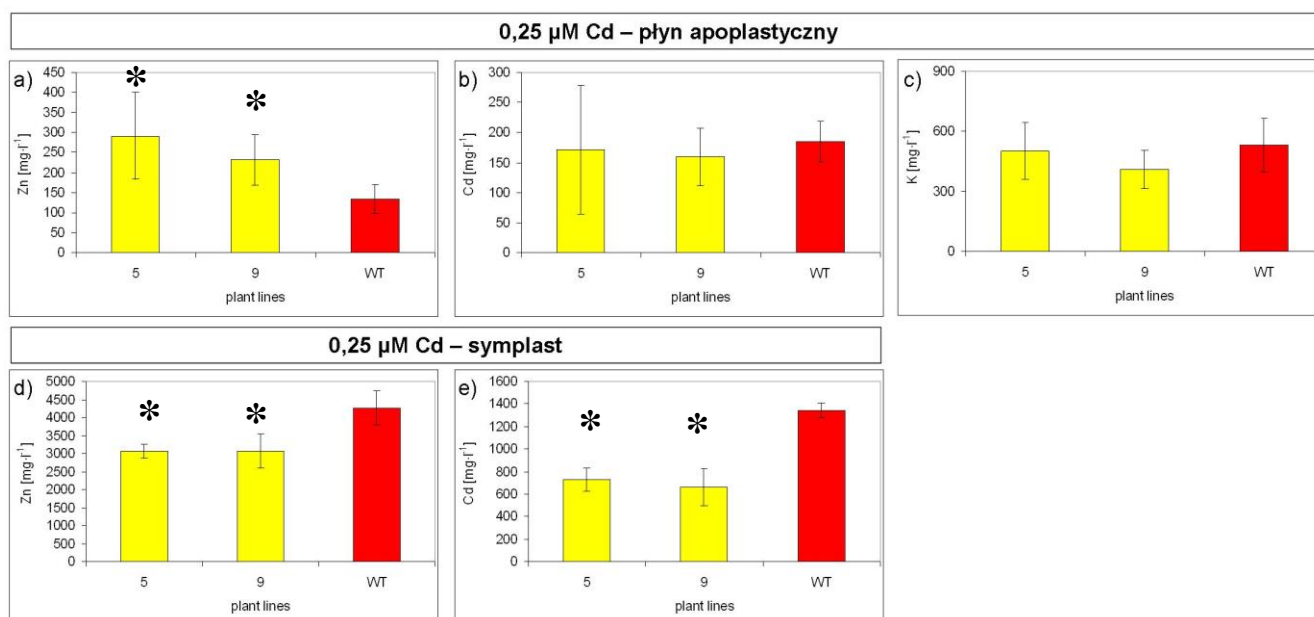


Fig. 41. Stężenie Zn (a i d), Cd (b i e) oraz K (c) w płynie apoplastycznym (a-c) oraz symplacie wyizolowanym z liści, z których izolowano płyn apoplastyczny (d i e). Liście pochodziły z roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linie 5 i 9 oraz roślin typu dzikiego WT, hodowanych 4 tygodnie na pożywce $\frac{1}{4}$ Knop'a i przez 4 dni w obecności 0,25 μ M Cd. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Otrzymane wyniki (Fig. 41) wskazują, że w płynie apoplastycznym liści roślin z ekspresją *AtHMA4-F* stężenie Zn jest 2-krotnie większe niż w przypadku liści pochodzących od roślin typu dzikiego (Fig. 41 a), natomiast stężenie Cd pozostawało na niezmiennym poziomie (Fig. 41 b). Nie było istotnych różnic w stężeniu K (Fig. 41 c), co wskazuje na brak uszkodzeń tkanki podczas izolacji płynu apoplastycznego. W symplacie liści pochodzących z 6-cio tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych przez 4 dni w obecności Cd obniżone jest zarówno stężenie Cd, jak i Zn w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 41 d i e).

Obniżenie stężenia Zn w symplacie i jego wzrost w apoplaście wskazują na zwiększenie eksportu Zn do apoplastu u roślin transgenicznych. Z analizy poziomu stężenia Cd w pędach roślin poddanych ekspozycji na ten metal wiadomo, że stężenie tego pierwiastka jest 2-krotnie niższe u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* niż u roślin typu dzikiego (Fig. 12 a i b). Pośrednio obniżenie stężenia Cd w symplacie i brak różnic w jego stężeniu w apoplaście u roślin transformowanych może wskazywać na wzrost eksportu Cd do apoplastu. Wyniki badań świadczą o zmianie proporcji pomiędzy stężeniem Zn i Cd pomiędzy symplastem a apoplastem u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd.

4.5.2. Analiza poziomu ekspresji genów endogennych w korzeniach tytoniu hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd – badania z wykorzystaniem mikromacierzy tytoniowych.

Ekspresja *AtHMA4-F* u roślin tytoniu hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd prowadzi do zmiany stosunku stężeń Cd, a także Zn pomiędzy apoplastem a symplastem w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 41). Zmiana dystrybucji Cd oraz także statusu Zn w komórkach (stężenie i dystrybucja w kompartmentach) może prowadzić do indukcji w tytoniu endogennych mechanizmów odpowiedzialnych za obniżenie pobierania Cd, ale też Zn z pożywki. Ich identyfikacji można dokonać między innymi poprzez analizę porównawczą poziomu ekspresji genów kodujących białka biorące udział w regulacji detoksykacji Cd (a także homeostazy Zn) pomiędzy roślinami z ekspresją *AtHMA4-F* a typu dzikiego. Proces regulacji homeostazy metali w roślinach, w tym w tytoniu, jest słabo poznany. Jedną z dostępnych metod badania zmian ekspresji wielu genów jednocześnie jest analiza z wykorzystaniem mikromacierzy. Zastosowano ją w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystując mikromacierze Affymetrix A-AFFY-135. RNA potrzebne do analizy wyizolowano z korzeni 5-tygodniowych roślin typu dzikiego oraz z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych przez 4 dni w obecności 0,25 μ M Cd (Fig. 4 schemat a).

Badania z wykorzystaniem mikromacierzy pokazały, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zmianie ekspresji uległy 123 geny (w porównaniu do roślin typu dzikiego). Spośród 123 genów 56 miało zwiększoną a 67 zmniejszoną ekspresję u roślin transformowanych. Tylko 18 genów miało ponad dwukrotnie zmniejszoną lub zwiększoną ekspresję, w pozostałych 105 genach ekspresja zmieniała się w granicach od 1,3 do 2 (lub od -1,3 do -2). Spośród 123 sekwencji tytoniu (wykryte przez sondy mikromacierzowe) 48 wcześniej opisano, pozostałe 75 sekwencji pozostaje nieznane. Sekwencje te porównano do sekwencji homologicznych z *Arabidopsis thaliana*. Wyniki analizy z użyciem mikromacierzy zostały dołączone do pracy w formie załącznika (nr 1). Poniżej przedstawiono rozkład zmian ekspresji genów pomiędzy roślinami z ekspresją *AtHMA4-F* a roślinami typu dzikiego (Fig. 42).

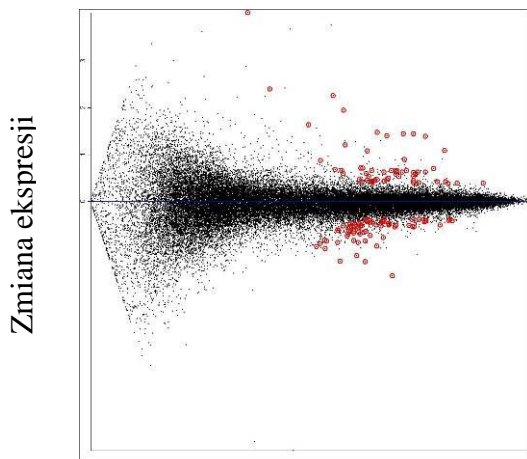


Fig. 42. Wykres przedstawiający rozkład zmian w ekspresji genów tytoniu pomiędzy roślinami z ekspresją *AtHMA4-F*, a typu dzikiego. Czerwonymi kółkami zaznaczono zmianę ekspresji genów spełniającą zadane kryteria ($FC > 1.3$ oraz $p > 0,05$).

4.5.3. Analiza kategorii funkcjonalnych według Gene Ontology (GO)

Badania wykazały zmiany w poziomie transkryptu pomiędzy roślinami z ekspresją *AtHMA4-F* a typu dzikiego dla 123 genów. Kodowały one białka o różnej lokalizacji w komórce, funkcji molekularnej oraz reprezentujące różne procesy biologiczne. Aby ocenić zmiany, jakie zaszły u roślin transformowanych w porównaniu do typu dzikiego, hodowanych w obecności 0,25 μM Cd, przeprowadzono analizę kategorii funkcjonalnych zgodnie z definicjami z bazy danych Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>). Dzięki takiej analizie można wskazać jakie komponenty komórkowe, procesy biologiczne i funkcje molekularne były reprezentowane przez geny, których ekspresja uległa modyfikacji w wyniku transformacji. Ze względu na mniejszą liczbę sekwencji szcharakteryzowanych w tytoniu, do klasyfikacji funkcjonalnej wyników badań mikromacierzowych (zgodnie ze standardami Gene Ontology), użyto sekwencji homologicznych *Arabidopsis thaliana*.

Liczba kategorii GO opisanych jako komponenty komórkowe (Fig. 43) reprezentowanych przez geny, których ekspresja uległa zmianie w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* zdominowana była

przede wszystkim przez „inne komponenty wewnątrzkomórkowe” (19.6 %) oraz „cytoplazmatyczne” (19.2 %). Należy zwrócić uwagę, że te dwie kategorie są także najliczniej reprezentowanymi kategoriami GO opisywanymi jako komponenty komórkowe. Geny o zmienionym poziomie ekspresji u roślin transformowanych należały także do kategorii „chloroplasty” (15.1 %), „inne membrany” (11,1%) oraz „plazmalemma” (4,1%). AtHMA4 odpowiada za eksport Zn z komórki, dlatego ważna była detekcja zmian ekspresji genów kodujących białka o lokalizacji pozakomórkowej (4,1%) w tym w ścianie komórkowej (2,2 %).

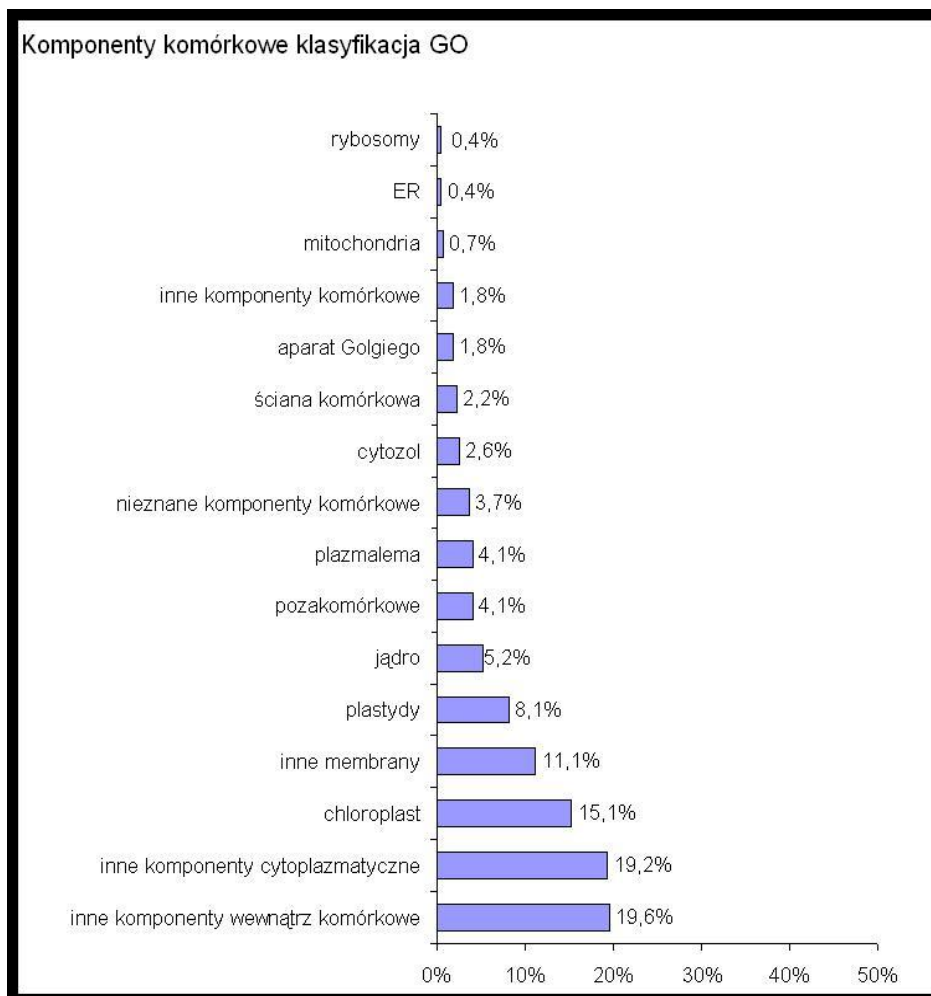


Fig. 43. Klasyfikacja funkcjonalna zgodna z terminologią Gene Ontology (GO). Przedstawiono kategorie „komponenty komórkowe” przyporządkowane dla genów, których ekspresja uległa zmianie u roślin transformowanych *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego. Rośliny były hodowane przez 4 dni w obecności 0,25 μM Cd.

Wyniki klasyfikacji GO ze względu na procesy biologiczne (Fig. 44) reprezentowanej przez geny, których ekspresja uległa zmianie u roślin transformowanych (w stosunku do typu dzikiego) wykazała głównie „inne procesy komórkowe” (26.7 %) oraz „procesy metaboliczne” (19.6 %). Należy zwrócić uwagę, że obie powyższe kategorie są najliczniej reprezentowane w kategoriach GO opisujących procesy biologiczne. Znaczący odsetek genów o zmienionej ekspresji u roślin transgenicznnych dotyczy „odpowiedzi na abiotyczny -” lub „biotyczny - bodziec” (11,8%) oraz

„stres” (9,6%). Taki wynik może być rezultatem odmiennej odpowiedzi na Cd występującej u roślin transgeniczných w stosunku do typu dzikiego. Istotnie większa ilość genów o zmienionej ekspresji u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* reprezentowała kategorie związane z transportem (7,2 %) (Fig. 44).

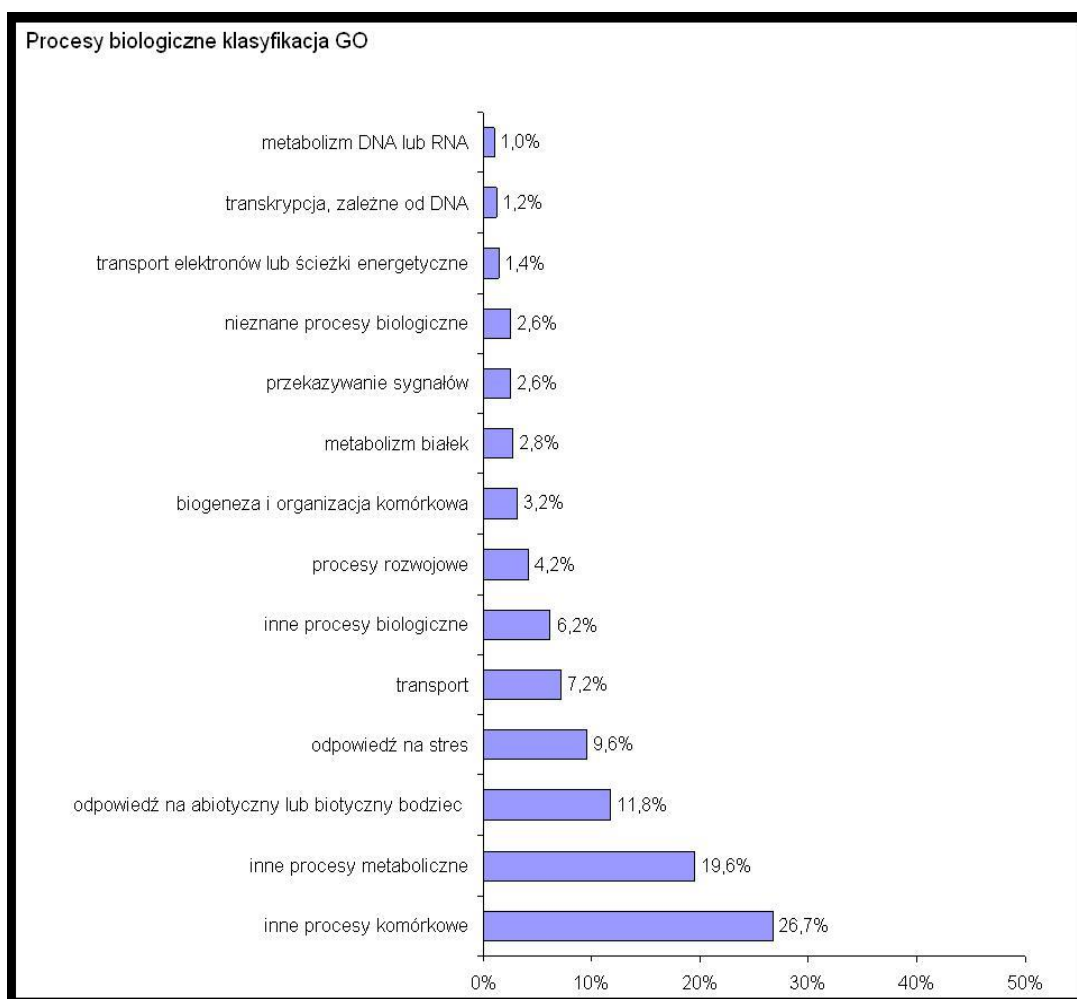


Fig. 44. Klasyfikacja funkcjonalna zgodna z terminologią Gene Ontology (GO). Przedstawiono kategorie „Procesy biologiczne” przyporządkowane dla genów, których ekspresja uległa zmianie u roślin z transformowanych *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego. Rośliny były hodowane przez 4 dni w obecności 0,25 μ M Cd.

Klasyfikacja GO pod kątem funkcji molekularnej (Fig. 45) wskazała, że geny, których ekspresja uległa zmianie u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w stosunku do typu dzikiego reprezentowały głównie kategorie: „inne aktywności enzymatyczne” (22.1 %), „składniki wiążące”

(18.6 %), „aktywności transferaz” (11,7 %) oraz w nieco mniejszym stopniu „aktywność hydrolaz” (7,6 %) i „aktywność transportowa” (7,6 %).

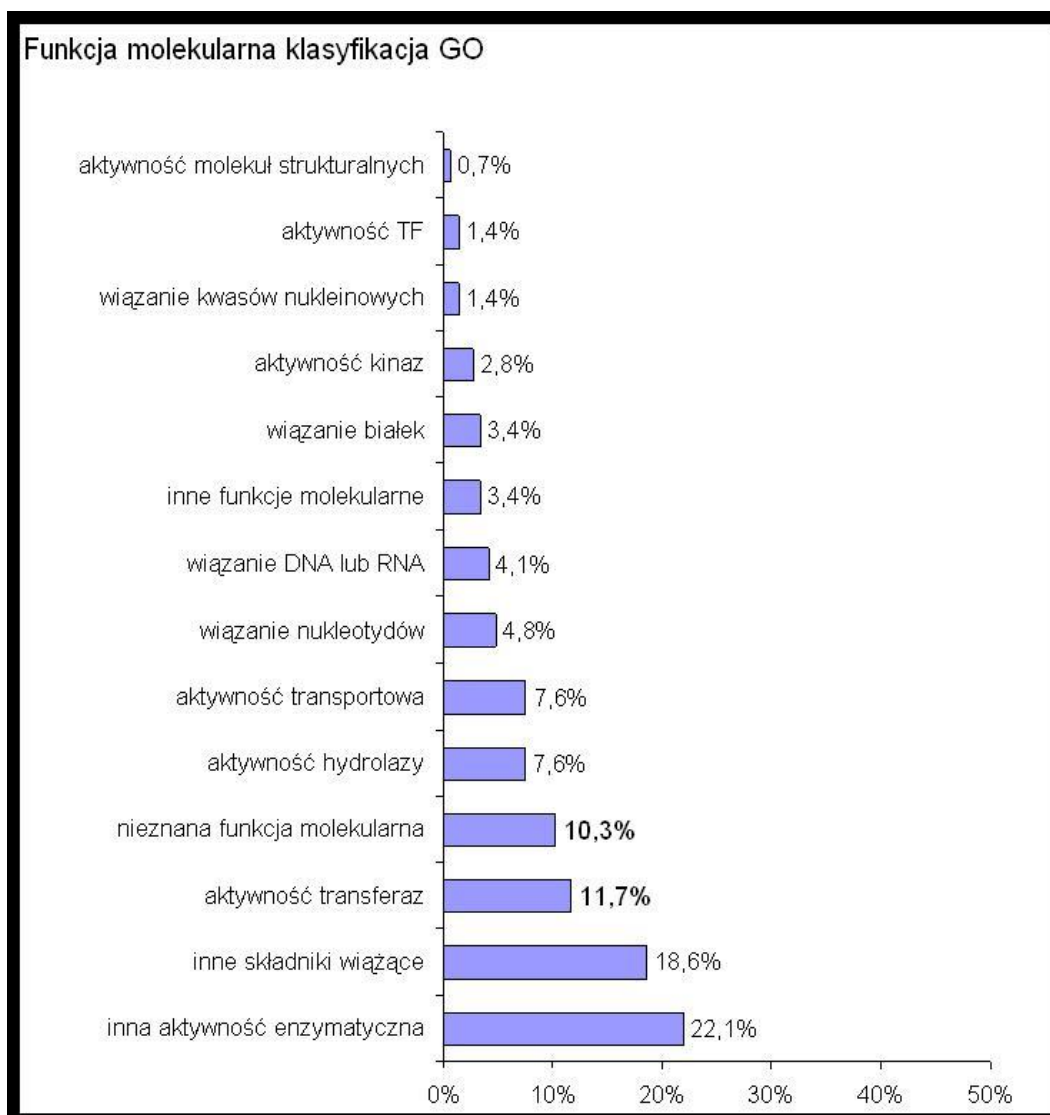


Fig. 45. Klasyfikacja funkcjonalna zgodna z terminologią Gene Ontology (GO). Przedstawiono kategorie „Funkcja molekularna” przyporządkowane dla genów, których ekspresja uległa zmianie u roślin z transformowanych *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego. Rośliny były hodowane przez 4 dni w obecności 0,25 μ M Cd.

Kolejnym narzędziem bioinformatycznym wykorzystanym do analizy wyników mikromacierzy było badanie reprezentatywności kategorii GO w puli wyników. Każda kategoria GO jest reprezentowana przez określoną liczbę genów. Frekwencja genów w kategorii GO jest określona jako stosunek liczby genów reprezentujących daną kategorię do wszystkich znanych genów (zapisanych w bazie GO). Parametr ten wskazuje na potencjalny udział danego procesu np. reprezentowanego przez kategorię GO, we wszystkich procesach w roślinie. Analogicznie, frekwencja genów o zmienionej ekspresji w otrzymanych wynikach badań to stosunek liczby genów o zmienionej ekspresji reprezentujących kategorie GO do wszystkich genów o zmienionej

ekspresji. Porównanie frekwencji występowania genów w kategoriach GO (wszystkich genów w bazie danych oraz o zmienionej ekspresji w otrzymanych wynikach) pozwala na określenie czy w puli genów o zmienionej ekspresji istnieje nadreprezentacja danej kategorii GO. Nadreprezentacja genów w kategorii GO może wystąpić, gdy w roślinie transformowanej uruchamiane są dodatkowe procesy wynikające z ekspresji transgenu (w ramach tej pracy byłyby to np. procesy prowadzące do ograniczenia pobierania Cd). W takim wypadku w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, w kategorii GO "transport" może nastąpić nadreprezentacja wynikająca z pojawienia się zmian w ekspresji genów kodujących białka, które odpowiadają za pobieranie metali.

Dzięki analizie poziomu częstości występowania genów o zmienionym poziomie ekspresji u roślin transformowanych (w stosunku do typu dzikiego) w kategoriach GO, można wskazać procesy indukowane w wyniku ekspresji *AtHMA4-F*. W celu sprawdzenia, czy wśród genów o zmienionej ekspresji istnieją takie, które nadreprezentują daną kategorię wykonano analizę "reprezentatywności terminów GO" z użyciem programu AmiGO - GO Term Enrichment. Oryginalny wynik (w języku angielskim) przedstawiono w załączniku 2, poniżej zreferowano najważniejsze jego punkty. Okazało się, że u roślin transgeniczných w stosunku do typu dzikiego duża liczba genów o zmienionej ekspresji należała do następujących kategorii (A% / **B%** A% - frekwencja tła, **B%** frekwencja w badanej puli):

- procesy biologiczne (Załącznik 2a) związane z odpowiedzią na stymulację GO:0050896 - 23% / **50%**:
 - GO:0009744 odpowiedź na stymulację sacharozą – 0,7% / **8,8%**,
 - GO:0006950 odpowiedź na stres – 13,7% / **26,5%**
 - GO:0009628 odpowiedź na stymulację abiotyczną – 9,1% / **26,5%**.
- procesy metaboliczne związane z drugorzędowymi procesami metabolicznymi GO:0019748 – 2,8% / **14,7%**.
- komponenty komórkowe (Załącznik 2b), związane z plastydami GO:0009536 – 13,2% / **32,4%** w tym między innymi w:
 - chloroplasty GO:0009507 – 13,0% / **32,4%**
 - tylakoidy GO: 0009579 – 1,7% / **14,7%**
 - błony tylakoidów GO:0042651 – 1,1% / **11,8%**
 - wakuola GO:0005773 – 2,8% / **14,7%**

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* widoczna jest nadreprezentacja genów o zmienionej ekspresji, zakwalifikowanych do kategorii związanych z drugorzędowymi procesami metabolicznymi oraz odpowiedzią na różnego rodzaju czynniki, w tym stres. U roślin

transgenicznych wykazano także nadreprezentację genów w kategoriach GO określających lokalizację komórkową - chloroplasty oraz wakuole.

W następnej kolejności wykonano analizę reprezentatywności w kategoriach GO, genów o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Nadreprezentowane geny, których ekspresja uległa **zmniejszeniu** w roślinach transformowanych *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego związane są z kategoriami GO wymienionymi poniżej:

- komponenty komórkowe (Załącznik 2 b), związane z plastydami GO:0009536 - 13,2% / **39,5%** w tym głównie z kategoriami:
 - chloroplasty GO:0009507 13,0% / **39,5%**
 - tylakoidy GO: 0009579 - 1,7% / **21,1%**

Nadreprezentowane geny o zmniejszonej ekspresji u roślin transformowanych należą do kategorii opisujących chloroplastową lokalizację komórkową. Wynik ten jednak nie wskazuje na możliwy mechanizm obniżenia pobierania Cd (oraz Zn) w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*.

Nadreprezentowane geny, których ekspresja uległa **zwiększeniu** w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego związane są tylko z jedną kategorią GO (Załącznik 2c):

- procesy metaboliczne związane z drugorzędowymi procesami metabolicznymi GO:0019748 – 2,8% / **23,3%**.

Nadreprezentowane geny o zwiększonej ekspresji u roślin transformowanych *AtHMA4-F* należą do kategorii GO związanych z drugorzędowymi procesami metabolicznymi i są to: *HCT*, *FNRI*, *GSTU8*, *KAI2*, *AT4G10490*, *AT1G51990*, *CYSC1* (łącza kierują do bazy danych GO i charakterystyki genu w języku angielskim).

Dwa spośród powyżej wymienionych genów kodują białka istotne dla szlaku biosyntezy lignin: *HCT*, *AT1G51990* (O-methyltransferase-like 2 protein). Obie sekwencje (homologiczne z *A. thaliana*) są znane w tytoniu i są to odpowiednio *NtHCT* oraz *NtOMT I*. Zmiana ekspresji genów *NtHCT* i *NtOMT I* istotnych dla biosyntezy lignin może wskazywać na procesy modyfikacji ściany komórkowej, łącznie z jej lignifikacją w korzeniach roślin transformowanych. Lignifikacja ściany komórkowej u roślin transformowanych może stać się fizyczną barierą ograniczającą transport wody wraz z jonami Cd^{2+} oraz Zn^{2+} , a także innych pierwiastków w korzeniu, przyczyniając się do ograniczenia pobierania w porównaniu do roślin typu dzikiego. Uwzględniając powyższą hipotezę oba geny zostały wybrane do dalszej weryfikacji i badań.

Otrzymane wyniki analiz ekspresji genów endogennych u roślin tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego hodowanych w obecności 0,25 μM Cd wskazują na to, że wprowadzenie

transgenu w istotnym stopniu wpływa na zmianę profilu ekspresji wielu genów endogennych tytoniu. Nie zidentyfikowano jednak genów o obniżonej ekspresji kodujących białka zaangażowane w pobieranie Cd. Podsumowując, żadna z obserwowanych zmian bezpośrednio nie tłumaczy obniżenia pobierania Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* rosnących w obecności 0,25 μM Cd.

4.5.4. Podsumowanie badań z wykorzystaniem mikromacierzy i przedstawienie najważniejszych wyników

Celem badań z użyciem mikromacierzy była identyfikacja genów homeostazy metali o zmienionym poziomie ekspresji u roślin transformowanych *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego, które mogłyby odpowiadać za obniżone pobieranie Cd (a także Zn) w obecności 0,25 μM Cd w pożywce. Badania klasyfikacji funkcjonalnej wskazały, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do uruchomienia wielu procesów metabolicznych, jednak nie wskazują one na mechanizm, który mógłby warunkować ograniczenie pobierania Cd. Warto dodać, że obniżeniu pobierania Cd u transformantów towarzyszy także obniżony poziom pobierania Zn. Do dalszych badań, wybrano następujące geny o zmienionej ekspresji u roślin transformowanych w porównaniu do typu dzikiego, których ekspresja może być związana z regulacją homeostazy metali w tytoniu:

- ***NtVCaB42*** (Gene Bank accession EB426333, homolog w *A. thaliana*: *AnnAt4*) - koduje białko z rodziny aneksyn, wielofunkcyjnych białek wiążących lipidy, zależnych od obecności jonów Ca^{2+} . Wiadomo, że aneksyny odpowiadają za regulację procesów oksydo-redukcyjnych, przekazywanie sygnałów lipidowych w celu koordynacji rozwoju rośliny, a także są one wskazywane jako białka charakterystyczne dla odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny (Laohavisit i Davies, 2011; Pirck i inni, 1994). Niewiele wiadomo o białku *NtVCaB42* w tytoniu, natomiast sekwencja homologiczna w *A. thaliana* koduje aneksynę 4 (*AnnAt4*), która może być zaangażowana w ochronę przed stresem abiotycznym, generowanym przez stres oksydacyjny. Wzrost ekspresji *AnnAt4* związany jest ze stresem solnym, oksydacyjnym lub osmotycznym. Ekspresja aneksyny 4 jest indukowana obecnością kwasu abscysynowego lub salicylowego natomiast obniżenie ekspresji następuje przy szoku cieplnym lub stresie odwodnienia (Lee i inni, 2004). Możliwe, że białko to zlokalizowane jest w plazmodesmach (Fernandez-Calvino i inni, 2011) w związku z czym może pełnić rolę w regulacji transportu symplastycznego. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zanotowano obniżenie ekspresji aneksyny *NtVCaB42*. Gen *NtVCaB42* został wybrany do dalszej weryfikacji biorąc pod uwagę ważną rolę jaką aneksyny odgrywają w regulacji procesów oksydo-redukcyjnych. Wiadomo, że Cd jest czynnikiem generującym tego typu stres. Znaczenie aneksyn w przekazywaniu informacji w roślinie może wskazywać na istotną rolę *NtVCaB42* w regulacji

odpowiedzi na zmianę stężenia Cd i Zn pomiędzy apoplastem a symplastem u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*.

- **NtHCT** (Gene Bank accession DW003425, homolog w *A. thaliana*: *AtHCT*) i **NtOMT I** (Gene Bank accession EB444811, homolog w *A. thaliana*: *O-methyltransferase-like 2 protein*). Oba geny kodują białka istotne dla szlaku biosyntezy lignin. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zanotowano wzrost poziomu ekspresji *NtHCT* i *NtOMT I*. Wzrost lignifikacji ścian komórkowych u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* może prowadzić do zahamowania transportu wody wraz z jonami Cd, co prowadziłoby do ograniczania pobierania przez roślinę tego pierwiastka.
- **NtPrx11a** (Gene Bank accession CQ809062, homolog w *A. thaliana* peroksydaza 52) - koduje peroksydazę, zlokalizowaną w ścianie komórkowej. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* nastąpił 3-krotny wzrost ekspresji *NtPrx11a*. Peroksydazy ściany komórkowej mogą brać udział w procesie wolnorodnikowej polimeryzacji lignin, dlatego wraz z *NtHCT* i *NtOMT I* mogą przyczyniać się do wzrostu lignifikacji ściany komórkowej u roślin transformowanych.
- **NtZIP1** (Gene Bank accession BP528234, homolog w *A. thaliana*: *AtZIP1*), *NtZIP1* (BP528234) może brać udział w pobieraniu Fe (Sano i inni, 2012). Gen homologiczny z *A. thaliana* koduje białko *AtZIP1* zlokalizowane w tonoplaście, które może brać udział w regulacji homeostazy Zn w odpowiedzi na deficyt tego pierwiastka. *AtZIP1* może także transportować Cd (Ramesh i inni, 2004; Milner i inni, 2013 r.). Ekspresja *NtZIP1* wzrosła 2-krotnie u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, co może świadczyć o powstałym w wyniku działania transgeny sygnale deficytu Zn. Co ciekawe, pomimo wzrostu ekspresji *NtZIP1* u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* nie następuje wzrost stężenia Zn. Potwierdzenie otrzymanego wyniku jest niezwykle istotne dla wyjaśnienia przyczyn obniżenia pobierania Cd u roślin transformowanych.
- **CAX3** (Gene Bank accession EB428626, homolog w *A. thaliana* *AtCAX3*). Sekwencja EB428626 jest sekwencją EST (ang. Expressed Sequence. Tags – sekwencyjny znacznik ekspresji), nie została opisana pod względem funkcjonalnym dla tytoniu, ale gen homologiczny w *A. thaliana* koduje *AtCAX3*, białko z rodziny CAX tonoplastowych antypoterów jonowo-wodorowych, które mogą brać udział w transporcie Zn i Cd oraz Ca do wakuoli. Ponad 2-krotny wzrost ekspresji sugeruje, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* uruchomiony został mechanizm akumulacji Ca w wakuoli. Wykazano także, że nadekspresja *AtCAX2* i *AtCAX4* w tytoniu prowadzi do zwiększenia stężenia Cd w korzeniach oraz wzrostu jego pobierania (Korenkov i inni, 2009). W związku z tym wydaje się możliwe, że wzrost ekspresji *CAX3* w transgenicznym tytoniu jest następstwem zmiany stężenia Cd (lub Cd i Zn) pomiędzy apoplastem a symplastem wynikającym z ekspresji *AtHMA4-F*.

W tabeli 2 przedstawiono podsumowanie informacji dostępnych w opisie sekwencji mikromacierzowych AFFyY-135 (wersja oryginalna – ang.) powyżej wymienionych genów (*NtVCaB42*, *NtHCT*, *NtOMT I*, *NtPrx11a*, *NtZIP1*, *CAX3*) wraz z pokazaniem poziomu zmiany ekspresji oraz istotności statystycznej wyniku, a także opisem kategorii GO, do których dany gen jest zakwalifikowany.

Numer akcesyjny Gene Bank	<i>N. tabacum</i> "best hit" (blast x) Numer akcesyjny	Definicja przypisana do sekwencji "best hit" <i>N. tabacum</i> (NCBI)	Fold Change	P-value	<i>A. thaliana</i> "best hit" (blast x) Numer akcesyjny	Definicja przypisana do sekwencji "best hit" <i>A. thaliana</i> (NCBI)	Max. podobieństwo sekwencji do <i>A. thaliana</i> "best hit" (NCBI)
Homeostaza metali							
EB428626	unknown	unknown	2,11	0,0105	AT3G51860	CAX3 (cation exchanger 3); cation:cation antiporter	68%
BP528234	AB505626	metal transporter NtZIP1	2,73	0,0177	AT3G12750 (AT1G05300)	AtZIP1 (ZINC TRANSPORTER 1 PRECURSOR) (highest homology of NtZIP1 to AtZIP5 - ZINC TRANSPORTER 5)	64% (59%)
Odpowiedź na stymulację chemiczną							
EB426333	AAD24540	vacuole-associated annexin NtVCaB42 calcium-dependent membrane-binding protein	-1,35	0,0228	AT2G38750	ANNAT4 (ANNEXIN ARABIDOPSIS 4); calcium ion binding / calcium-dependent phospholipid binding	49%
Ściana komórkowa/biosynteza lignin							
DW003425	Q8GSM7	Hydroxycinnamoyl transferase, transferase family protein. Acyltransferase involved in the biosynthesis of lignin NtHCT	1,33	0,0248	AT5G48930	hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase	36%
EB444811	CAA52461	catechol o-metyltransferase, involved in lignin biosynthesis NtOMT I	1,55	0,0313	AT5G54160	AtOMT1, encodes a flavonol 3'-O-methyltransferase that is highly active towards quercetin and myricetin	52%
CQ809062	BAA82306	peroxidase NtPrx11a (tpoxC1)	3,12	0,0008	AT5G05340	peroxidase 52, cell wall peroxidase	66%

Tabela 2. Geny wybrane na podstawie analiz bioinformatycznych i funkcji biologicznej kodowanych białek, spośród genów których ekspresja została zmieniona u roślin transformowanych (wyniki badań z użyciem mikromacierzy). Opis oryginalny (w j. ang.) pochodzący z bazy danych mikromacierzy Affy-135 oraz NCBI.

4.6. Weryfikacja poziomu ekspresji genów (wybranych na podstawie analizy mikromacierzowej), które mogłyby odpowiadać za ograniczenie pobierania Cd przez tytoń z ekspresją *AtHMA4-F*

Spośród puli genów o zmienionym poziomie ekspresji w roślinach transgenicznym (w porównaniu do typu dzikiego), zidentyfikowanych w wyniku analizy z zastosowaniem mikromacierzy wybrano sześć genów (tabela 2). Zgodnie z opisem w rozdziale 4.5.3 i 4.5.4 zmiana poziomu ich transkryptu może tłumaczyć obserwowane obniżenia pobierania Cd. Kolejnym etapem

było potwierdzenie otrzymanego wyniku poprzez analizę ilościową RT-PCR oraz ilościową Real-Time PCR.

Wyniki badań ekspresji metodami RT-PCR i PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) były zgodne z analizą mikromacierzową. Wykazano spadek ekspresji *NtVcaB42* oraz wzrost ekspresji *NtHCT*, *NtOMT I*, *CAX3*, *NtZIP1*, *NtPrx11a* w roślinach transformowanych w porównaniu do typu dzikiego hodowanych na pożywce zawierającej 0,25 μM Cd (Fig. 46 i 47).

Białko AtHMA4-F usuwa Cd oraz Zn poza komórkę, zatem jego aktywność w roślinach transgenicznym zwiększa stężenie Cd i Zn w apopląście i obniża w sympląście. Ograniczenie pobierania Cd przez rośliny transgeniczne może wynikać ze zmiany w ekspresji genów endogennych indukowanej zmienionym stosunkiem stężeń apoplast/symplast (w wyniku ekspresji *AtHMA4-F*) następujących metali: a) Cd, b) Zn lub c) Cd i Zn. Okazało się, że u roślin hodowanych w warunkach kontrolnych ekspresja *NtVcaB42*, *NtHCT*, *CAX3* i *NtPrx11a* była na takim samym poziomie u transformantów jak u roślin typu dzikiego (Fig. 46 i 47). Zatem obserwowany u roślin transgenicznym wzrost ekspresji, *NtHCT*, *CAX3* i *NtPrx11a* oraz niższy *NtVcaB42* był związany z obecnością Cd w pożywce. Analiza poziomu ekspresji *CAX3* przeprowadzona metodą RT-PCR i Real-Time PCR dała odmienne wyniki (Fig. 46 g i h, Fig. 47 a i b). Ze względu na wyższą dokładność metody Real-Time PCR i powtarzalność w kolejnych próbach, wynik otrzymany tą metodą przyjęto za prawdziwy. Wskazuje on, że ekspresja *CAX3* nie różni się pomiędzy roślinami transformowanymi, a typu dzikiego rosnącymi w warunkach kontrolnych (Fig. 47a).

U roślin hodowanych na pożywce kontrolnej (bez Cd) ekspresja *NtOMT I* była niższa u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* niż u roślin typu dzikiego. U roślin transformowanych poddanych ekspozycji na Cd ekspresja *NtOMT I* była wyższa niż u roślin typu dzikiego (Fig. 46 e i Fig. 47 b). Taki wynik wskazuje na istotne rolę, jaką odgrywa obecność Cd w regulacji ekspresji *NtOMT I* u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*.

Ekspresja *NtZIP1*, u roślin hodowanych na pożywce zawierającej 0,5 μM Zn bez dodatku Cd jak i w obecności Cd, jest większa u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* niż u roślin typu dzikiego (Fig. 47 a, b). Wynik ten wskazuje, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zachodzi indukcja sygnału świadczącego o deficycie tego pierwiastka, pomimo że jedynie w obecności Cd całkowite stężenie Zn w korzeniach jest obniżone (Fig. 10 a i 14 a).

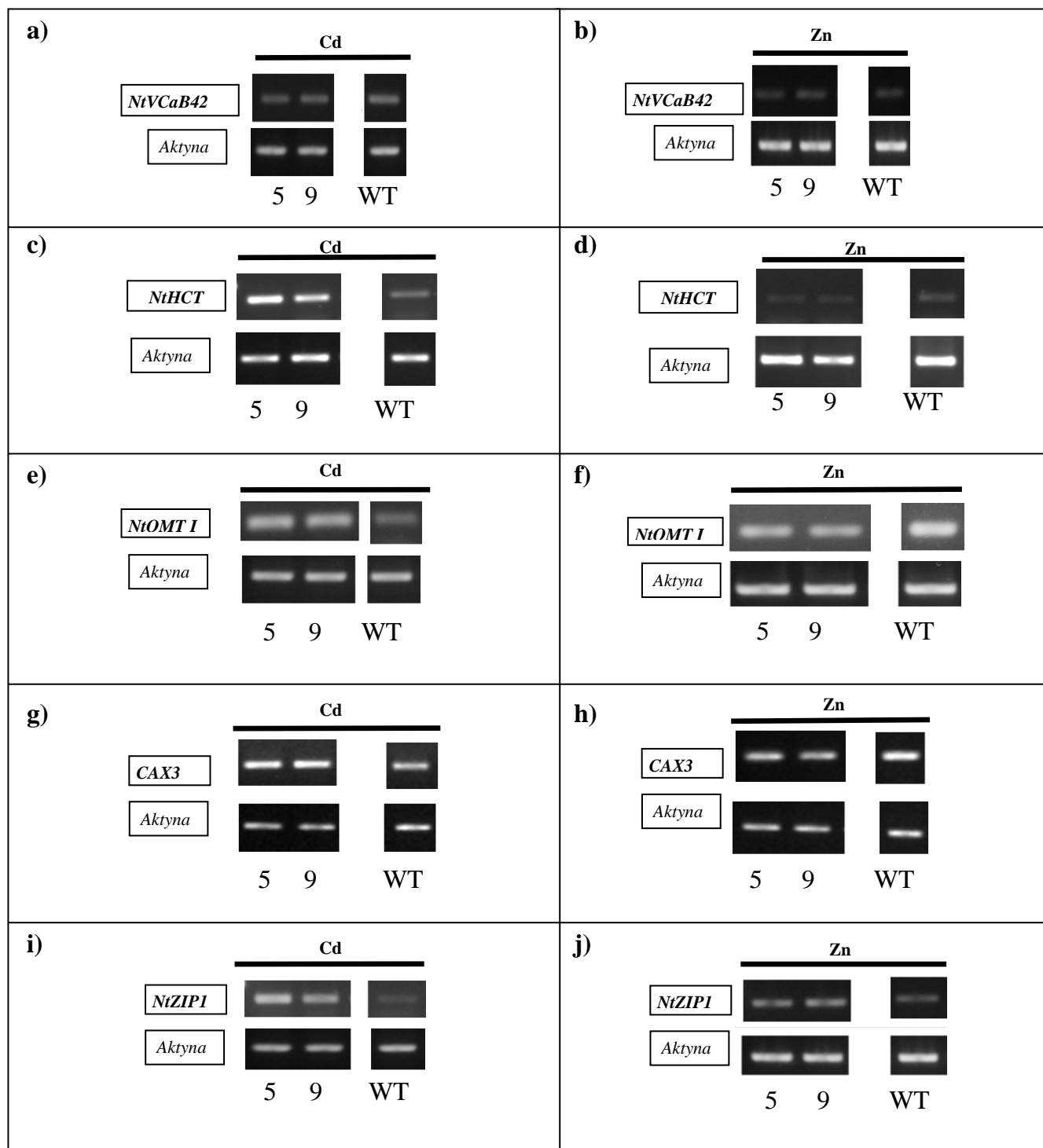


Fig. 46. Poziom ekspresji genów *NtVCaB42* (EB426333), *NtHCT* (DW003425), *NtOMT I* (EB444811), *CAX3* (EB428626), *NtZIP1* (BP528234) w 5-tygodniowych roślinach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd przez 4 dni (a, c, e, g, i) oraz hodowanych w warunkach kontrolnych bez dodatku Cd (b, d, f, h, j). Wynik badania ekspresji metodą ilościową RT-PCR. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

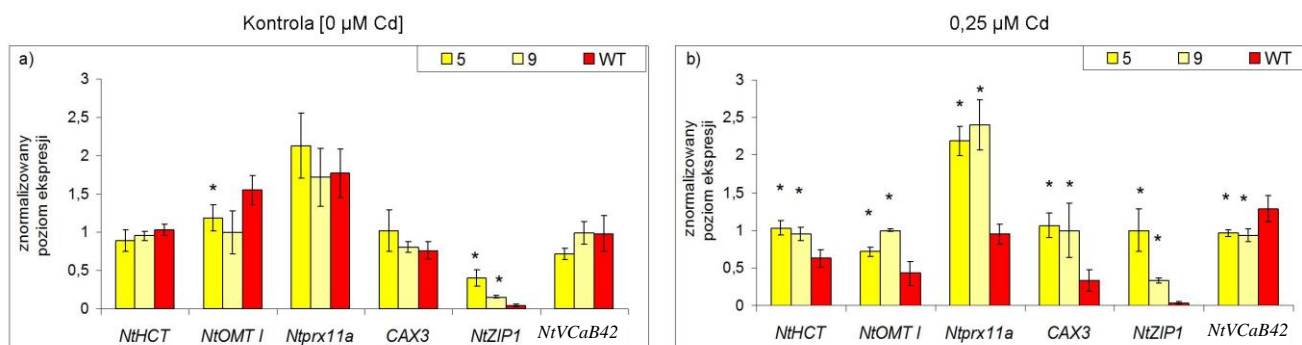


Fig. 47. Poziom ekspresji genów *NtVcAB42* (EB426333), *NtHCT* (DW003425), *NtOMT1* (EB444811), *CAX3* (EB428626), *NtZIP1* (BP528234) oraz *NtPrx11a* (CQ809062) w 5-tygodniowych roślinach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd przez 4 dni b) oraz hodowanych w warunkach kontrolnych bez dodatku Cd a). Wynik badania ekspresji metodą półilościową PCR w czasie rzeczywistym. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

4.7. Analiza poziomu transkryptu genów dodatkowych (kodujących białka mogące uczestniczyć w transporcie Cd lub regulacji homeostazy metali) w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego

Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem mikromacierzy oraz ich weryfikacja metodą RT-PCR i PCR w czasie rzeczywistym wskazały między innymi na zmianę ekspresji genów zaangażowanych w pobieranie Zn i Cd (*NtZIP1*) oraz sekwestrację tych pierwiastków w wakuoli (*CAX3*). Poziom ekspresji *NtZIP1* jak i *CAX3* był wyższy u roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego, co sugeruje uruchomienie mechanizmów, które mogłyby prowadzić do wzrostu pobierania i akumulacji Zn i Cd w korzeniach.

Pośród sekwencji wchodzących w skład mikromacierzy Affy-135 nie znalazły się geny, o których wiadomo, iż kodują białka mogące odpowiadać za pobieranie Zn i Cd - *NtIRT1* oraz za ich transport do wakuoli - *NtMTP1a* i *NtHMA3*. *NtIRT1* koduje transporter Fe z rodziny ZIP odpowiedzialny za pobieranie Fe ale także Zn i Cd przy deficycie Fe. *NtMTP1a* i *NtHMA3* kodują transportery tonoplastowe Zn i Cd odpowiedzialne za transport tych pierwiastków do wakuoli. Wzrost ekspresji *NtMTP1a* i *NtHMA3* może prowadzić do zwiększenia poziomu akumulacji Zn i Cd w komórce i w konsekwencji do wzrostu tolerancji na Zn i Cd (Bovet i inni, 2006). Kolejnym, ważnym genem zaangażowanym w regulację homeostazy Zn i Fe i ich translokacji do pędu jest *NtNAS1*, kodujący syntazę nikotianaminy - enzymu, który odpowiada za syntezę nikotianaminy (chelatora Fe i Zn). Zatem porównanie poziomów transkryptów genów *NtIRT1*, *NtNAS1*, *NtMTP1a* i *NtHMA3* może dostarczyć informacji o potencjalnym mechanizmie obniżenia pobierania Zn i Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*. Analizę ekspresji genów *NtIRT1*, *NtNAS1*, *NtMTP1a* i *NtHMA3*

metodą RT-PCR i PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono dla materiału pobranego z roślin hodowanych w pożywce ¼ pożywki Knop'a oraz w obecności 0,25 µM Cd przez 4 dni.

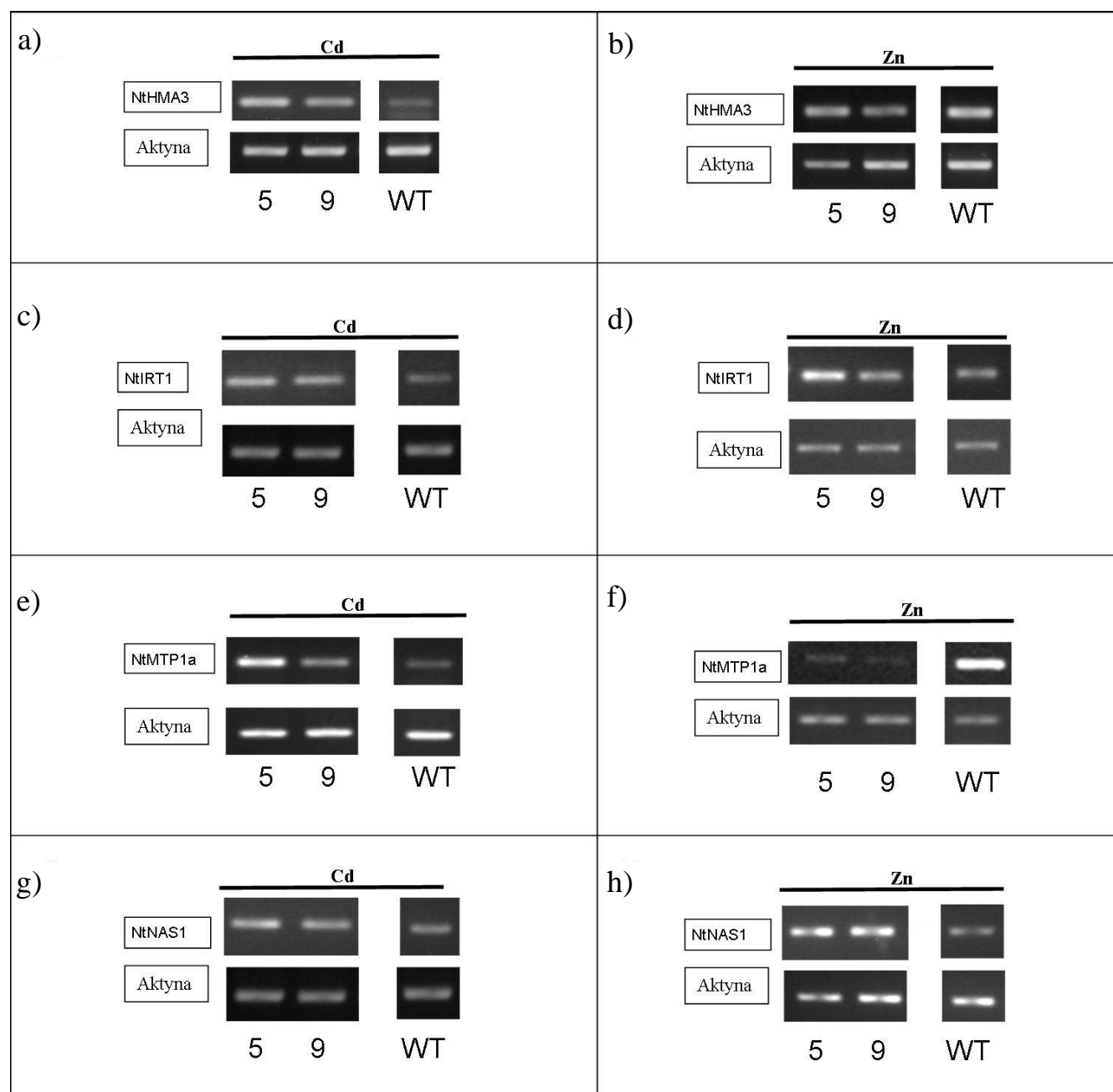


Fig. 48. Poziom ekspresji genów *NtHMA3*, *NtIRT1*, *NtMTP1a*, *NtNAS1* w 5-tygodniowych roślinach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) poddanych ekspozycji na 0,25 µM Cd przez 4 dni (a, c, e, g) oraz hodowanych w warunkach kontrolnych bez dodatku Cd (b, d, f, h). Wynik badania ekspresji metodą półilościową RT-PCR.

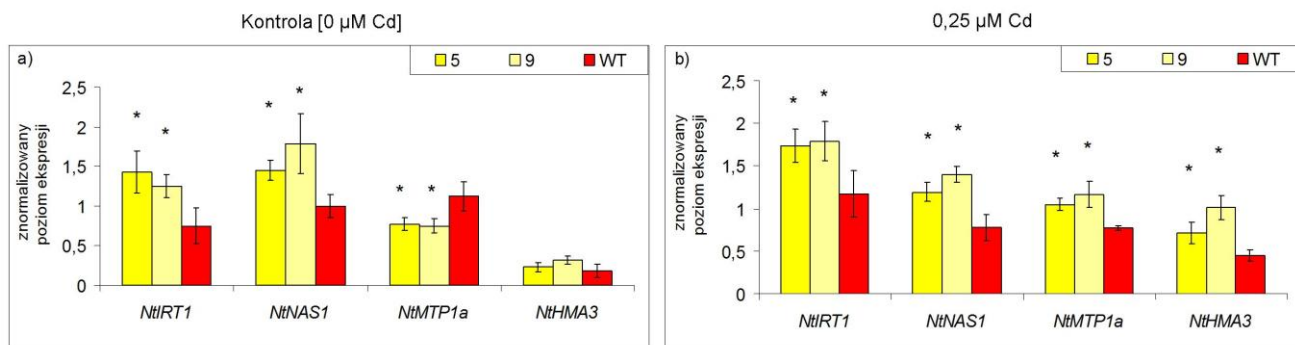


Fig. 49. Poziom ekspresji genów *NtHMA3*, *NtIRT1*, *NtMTP1a*, *NtNAS1* w 5-tygodniowych roślinach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (linie nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w warunkach kontrolnych bez dodatku Cd (a) oraz poddanych ekspozycji na 0,25 μ M Cd przez 4 dni (b). Wynik badania ekspresji metodą ilościową Real-Time PCR. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Analiza ekspresji metodą RT-PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym wskazała na wzrost poziomu transkryptu *NtHMA3*, *NtIRT1*, *NtMTP1a*, *NtNAS1* w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego hodowanych na pożywce zawierającej 0,25 μ M Cd (Fig. 48 i 49). Wzrost ekspresji *NtMTP1a* i *NtHMA3* (Fig. 49 b), podobnie jak wcześniej zaobserwowany wzrost ekspresji *CAX3* (Fig. 48 b) sugeruje, że u roślin transgeniczných zainicjowane są procesy odpowiedzialne za zwiększenie poziomu transportu Zn, Cd oraz Ca do wakuoli. Zwiększenie eksportu Zn i Cd z cytoplazmy do wakuoli może skutkować zwiększeniem poziomu tolerancji na te metale. Gdy rośliny z ekspresją *AtHMA4-F* hodowano w warunkach kontrolnych (0,5 μ M Zn), zaobserwowano u transformantów obniżoną ekspresję *NtMTP1a* oraz brak różnic w ekspresji *NtHMA3* w porównaniu do roślin typu dzikiego. Taki wynik wskazuje, że wzrost ekspresji *NtMTP1a* i *NtHMA3* u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zależy od obecności Cd w pożywce.

Notowany w obecności Cd wyższy poziom ekspresji *NtIRT1* u transformantów może wskazywać na stan deficytu Fe (co nie występuje w warunkach kontrolnych). Wiadomo, że *NtIRT1* oprócz Fe może transportować także Zn i Cd. W oparciu o dotychczasową wiedzę na temat regulacji pobierania jonów przez białko IRT1 (Korshunova i inni, 1999; Connolly i inni, 2002; Colangelo i Guerinot, 2006; Lin i inni, 2009) można oczekiwać, iż w warunkach deficytu Fe następuje wzrost ekspresji *NtIRT1* i bardziej efektywne pobieranie nie tylko Fe, ale także Zn i Cd. Stężenie Zn i Cd w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* jest jednak mniejsze niż u roślin typu dzikiego. Badania wykazały także, iż ekspresja nie tylko *NtIRT1*, ale też *NtNAS1* jest indukowana w roślinach transgeniczných, zarówno w warunkach kontrolnych, jak też w obecności Cd (Fig. 49). Sugeruje to, że obecność Cd nie jest istotna dla wzrostu ekspresji *NtNAS1* i *NtIRT1* u roślin transgeniczných.

4.8. Analiza cytologiczna i biochemiczna

Jedną z kategorii funkcjonalnych GO nadreprezentowanych przez geny, których ekspresja uległa zmianie u roślin transgeniczných, były drugorzędowe procesy metaboliczne (GO:0019748), wśród których znalazły się geny kluczowe dla szlaku biosyntezy lignin – *AtHCT* oraz AT1G51990, oba mające swoje homologi w tytoniu odpowiednio *NtHCT* oraz *NtOMT 1*. Analiza metodą Real-Time w celu weryfikacji danych mikromacierzowych potwierdziła zwiększony poziom ekspresji genów ze szlaku biosyntezy lignin: *NtHCT*, *NtOMT 1*, a także *Ntprx11a* kodującego peroksydazę ściany komórkowej (która może brać udział w procesie polimeryzacji lignin; Fig. 47).

Wzrost lignifikacji ścian komórkowych w korzeniu może prowadzić do ograniczenia transportu wody zawierającej Cd oraz inne pierwiastki w obrębie apoplastu. Lignifikacja ścian komórkowych w korzeniu u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* może w mechaniczny sposób ograniczyć poziom pobierania Cd przez roślinę. Aby sprawdzić poziom lignifikacji ścian komórkowych w korzeniach badanych roślin wykonano:

- barwienie fluorescencyjne lignin safraniną
- analizę poziomu autofluorescencji lignin

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* ekspresja *Ntprx11a* (kodująca peroksydazę ściany komórkowej) wzrosła 3-krotnie (Fig. 47 b). Wiadomo, że peroksydazy mogą brać udział w wolnorodnikowej polimeryzacji lignin w ścianie komórkowej. Podstawowe elementy tego procesu związane są z obecnością nadtlenu wodoru oraz wzrostem aktywności tych peroksydaz, dlatego przeprowadzono także:

- analizę akumulacji H_2O_2 , metodą DAB. H_2O_2 jest substratem lub produktem działania peroksydaz i może być zaangażowany w proces polimeryzacji lignin;
- poziomu całkowitej aktywności peroksydaz i aktywności peroksydaz jonowo związanych ze ścianą komórkową.

4.8.1. Analiza poziomu lignifikacji ścian komórkowych

Właściwości chemiczne lignin (wynikające między innymi z dużej ilości aromatycznych grup funkcyjnych) powodują ich bardzo silną autofluorescencję przy wzbudzeniu w świetle ultrafioletowym z silną emisją przede wszystkim w zakresie niebieskim i zielonym (Bond i inni, 2008). Podobne właściwości mają także suberyny, w związku z czym trudno jest rozróżnić ligniny od suberyn w analizie autofluorescencji. Dlatego do analizy poziomu lignifikacji wykorzystano metodę z użyciem O-safraniny, która jest barwnikiem fluorescencyjnym używanym do detekcji lignin. Safranina bardzo silnie wiąże się z ligninami dając fluorescencję w zakresie światła czerwonego oraz z celulozą dając fluorescencję w zakresie światła zielonego. Dzięki takim właściwościom możliwe jest rozróżnienie bogatych w ligniny lub celulozę ścian komórkowych (Bond i inni, 2008). Widmo emisyjne związane z autofluorescencją lignin rozciąga się na całe spektrum światła, jednak sygnał ten jest co najmniej 10x słabszy niż sygnał fluorescencji lignin z O-safraniną w zakresie światła czerwonego, nie wpływając dzięki temu na możliwość detekcji różnic w lignifikacji przy użyciu tego barwnika (Bond i inni, 2008). Analizę lignifikacji ścian komórkowych z użyciem safraniny i pomiarów autofluorescencji lignin przeprowadzono na przekrojach poprzecznych korzeni roślin typu dzikiego w odległości 2 cm od stożka wzrostu, zarówno dla roślin hodowanych w pożywce zawierającej 0,25 μM Cd, jak i w warunkach kontrolnych (1/4 pożywki Knop'a).

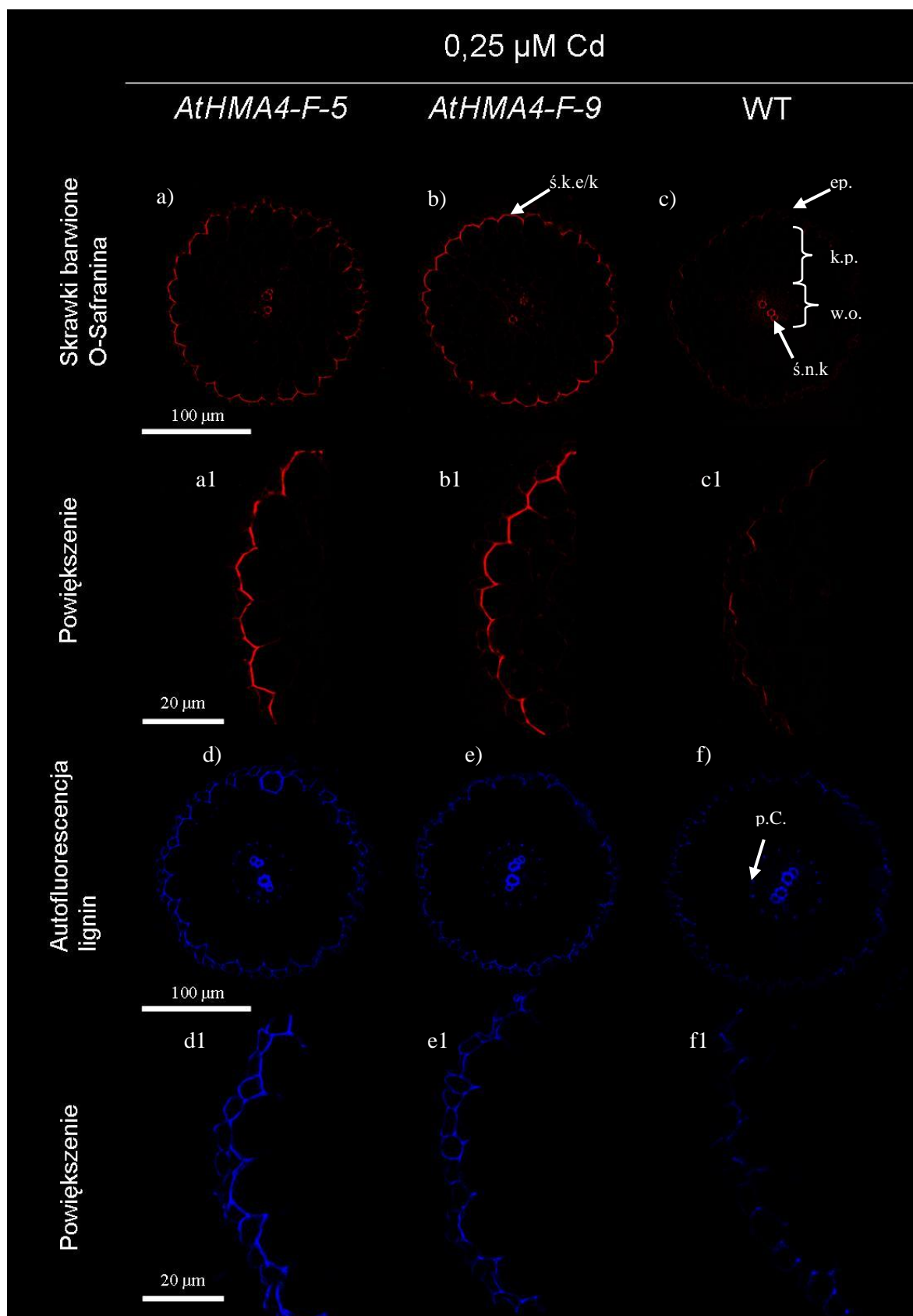


Fig. 50. Poziom lignifikacji. Obraz po barwieniu lignin O-safraniny (a-c i a1-c1). Obraz autofluorescencji lignin (d-f i d1-f1). Badania wykonano na przekrojach poprzecznych korzeni na wysokości 2 cm nad stożkiem wzrostu u 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linia nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) poddanych ekspozycji na 0,25 μ M Cd przez 4 dni. a1-f1 powiększenie obrazów a-f. ep. – epiderma, k.p. – kora pierwotna w.o. – walec osiowy ś.n.k. – ściany naczyń ksylemu ś.k.e/k – ściana komórkowa pomiędzy epidermą a korą pierwotną, p.C. – pasemka Caspariego.

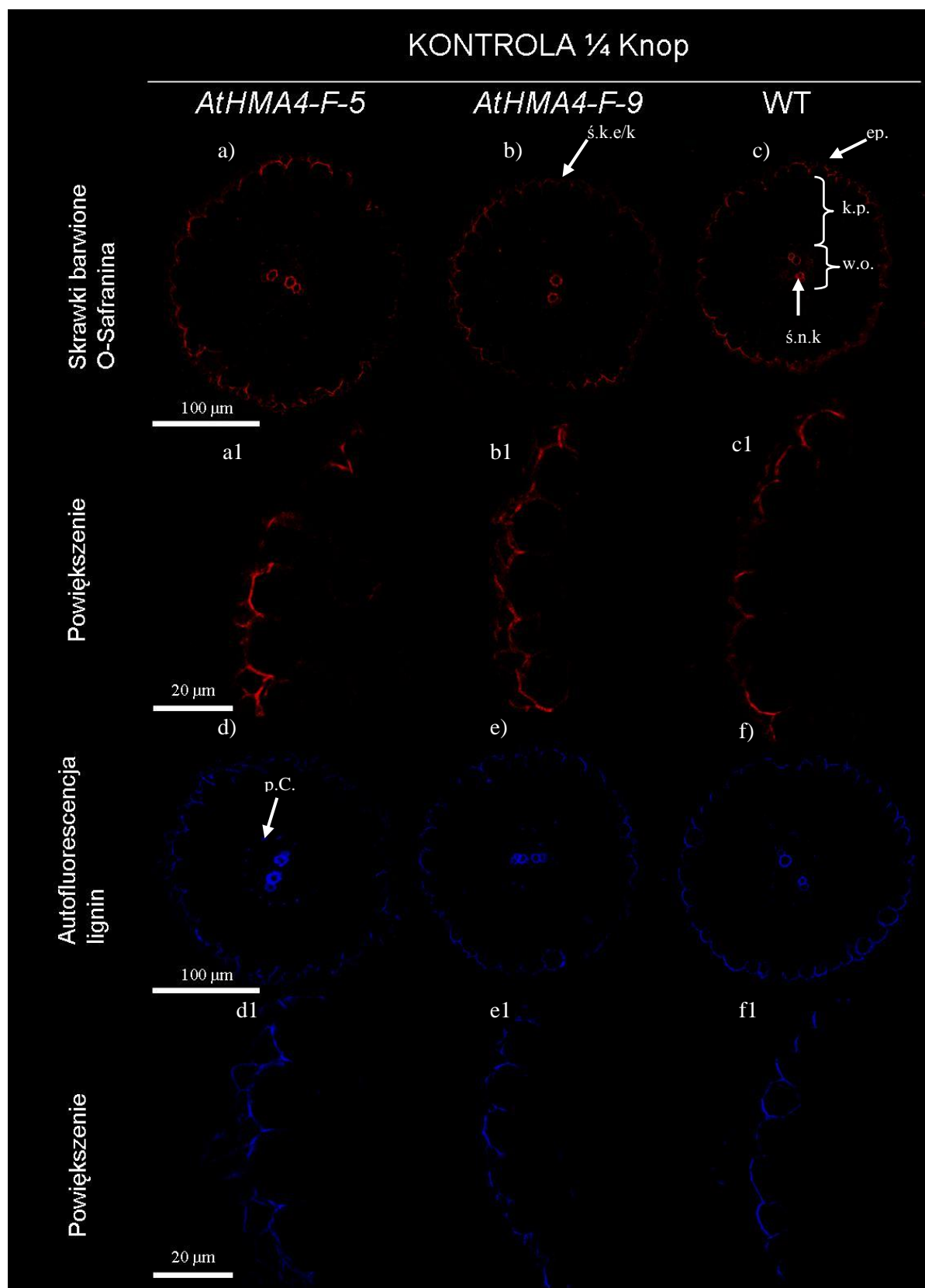


Fig. 51. Poziom lignifikacji. Obraz po barwieniu lignin O-safraniny (a-c i a1-c1). Obraz autofluorescencji lignin (d-f i d1-f1). Badania wykonano na przekrojach porzecnych korzeni na wysokości 2 cm nad stożkiem wzrostu 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linia nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w warunkach kontrolnych (0,5 µM Zn). a1-f1 powiększenie obrazów a-f. ep. – epiderma, k.p. – kora pierwotna w.o. – walec osiowy ś.n.k. – ściany naczyń ksylemu ś.k.e/k – ściana komórkowa pomiędzy epidermą a korą pierwotną, p.C. – pasemka Caspariego.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na Cd można zaobserwować zwiększony w stosunku do roślin typu dzikiego poziom fluorescencji O-safraniny (Fig. 50 a i b do c) oraz autofluorescencji lignin (Fig. 50 d i e do f) w peryklinalnych ścianach komórkowych pomiędzy epidermą, a pierwszą warstwą kory pierwotnej. W korzeniach u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* obserwujemy wzrost lignifikacji tylko w jednej specyficznej ścianie komórkowej.

Poziom autofluorescencji lignin (Fig. 51 a i b do c) i fluorescencji o-safraniny (Fig. 51 d i e do f) w ścianie komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną nie różnił się pomiędzy roślinami transformowanymi a typu dzikiego hodowanymi na pożywce kontrolnej (1/4 pożywki Knop'a). Poziom lignifikacji u roślin hodowanych bez Cd (transgenicznym i typu dzikiego) jest słabszy niż u roślin transgenicznym hodowanych w obecności Cd (Fig. 50 i 51).

Podsumowując, u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zaobserwowano wzrost lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną. Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi u roślin hodowanych w obecności Cd do indukcji mechanizmów odpowiedzialnych za lignifikację, co przyczynia się do ograniczenia pobierania Cd.

4.8.2. Analiza poziomu H₂O₂

U roślin transgenicznym, w porównaniu do roślin typu dzikiego poddanych ekspozycji na 0,25 µM Cd, znacząco wzrósł poziom ekspresji peroksydazy ściany komórkowej *Ntprx11a* (Fig. 47 b). H₂O₂ może być zarówno substratem, jak i produktem działania peroksydaz. H₂O₂, jak i peroksydazy, biorą udział w polimeryzacji lignin (Whetten i Sederoff, 1995; Passardi i inni, 2004), mogą więc przyczyniać się do obserwowanego wzrostu lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną. Aby to sprawdzić, wykonano badania lokalizacji i akumulacji nadtlenu wodoru na przekrojach poprzecznych korzeni roślin transformowanych genem *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego z wykorzystaniem metody DAB (3,3'-diaminobenzidyna). DAB specyficznie reaguje z nadtlakiem wodoru tworząc brązowe kompleksy w miejscach jego obecności (Thordal-Christensen'a i inni, 1997). Rośliny hodowano w obecności Cd zgodnie ze schematem a) z Fig 4. oraz na pożywce kontrolnej.

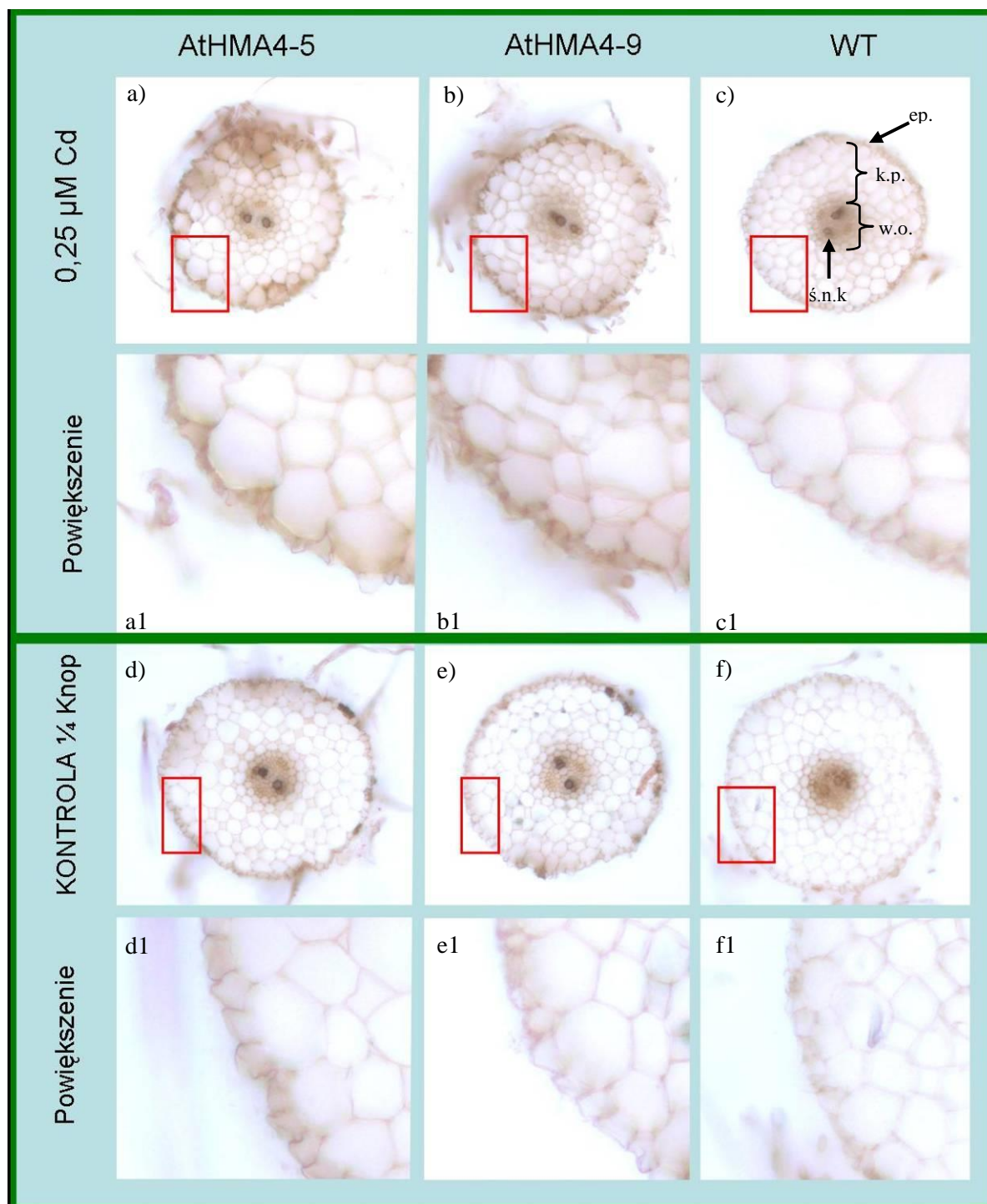


Fig. 52. Lokalizacja i poziom akumulacji H_2O_2 na przekrojach poprzecznych wykonany w odległości 2 cm nad stożkiem wzrostu korzenia. 5-tygodniowe rośliny z ekspresją *AtHMA4-F* (linia nr 5 i 9) oraz typu dzikiego (WT) hodowano w obecności 0,25 μM przez 4 dni, (a-c i a1-c1) oraz kontrolnych (d-f i d1-f1). Powiększenie obrazów a1-c1 oraz d1-f1. Analiza wykonana z zastosowaniem DAB. Brązowe zabarwienie świadczy o reakcji DAB w obecności H_2O_2 , w której wytrąca się on w formie brązowych nierozpuszczalnych depozytów. ep. – epiderma, k.p. – kora pierwotna, w.o. – walec osiowy, ś.n.k. – ściany naczyń ksylemu

U roślin transformowanych i typu dzikiego, zarówno w obecności Cd, jak i w warunkach kontrolnych, H_2O_2 był zlokalizowany w obrębie naczyń ksylemu i w walcu osiowym (Fig. 52). W obu typach roślin hodowanych w warunkach kontrolnych nie zaobserwowano obecności H_2O_2 w obrębie epidermy i pierwszej warstwy kory pierwotnej. U tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*,

w odróżnieniu od roślin typu dzikiego hodowanych w obecności Cd, zaobserwowano nagromadzenie się H_2O_2 (o czym świadczą brązowe złogi) w epidermie i ścianie komórkowej pomiędzy epidermą a pierwszą warstwą kory pierwotnej (Fig. 52 a, a1; b, b1 i c, c1). Jak pokazano wcześniej, u roślin transgeniczných w porównaniu do typu dzikiego następuje wzrost lignifikacji, także w ścianie komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną (Fig. 50 a i b). Oba wyniki mogą wskazywać na potencjalną rolę nadtlenu wodoru w procesie lignifikacji tej ściany komórkowej u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*.

4.8.3. Analiza aktywności peroksydaz: wszystkich i jonowo związanych ze ścianą komórkową

Przedstawione badania wskazywały, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* rosnących w obecności Cd następuje wzrost lignifikacji i poziomu H_2O_2 w ścianie komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną (Fig. 50 a i b, Fig. 52 a i b). Wiadomo, że peroksydazy ściany komórkowej biorą udział w procesie polimeryzacji lignin (Whetten i Sederoff, 1995; Boerjan i inni, 2003).

Aby porównać poziom aktywności peroksydaz u roślin transformowanych i typu dzikiego wykonano analizę enzymatyczną z użyciem gwajakolu, substratu dla peroksydaz (Cordoba-Pedregosa i inni, 1996). Ekstrakt białkowy zawierający peroksydazy wyizolowano z korzeni (z odcinka pomiędzy 2 a 5 cm od stożka wzrostu) roślin poddanych ekspozycji na Cd i rosnących w warunkach kontrolnych. W części ekstraktu białkowego oznaczono enzymatycznie całkowitą aktywność peroksydaz komórkowych (czyli taką, która dotyczy wszystkich możliwych do zbadania w ekstrakcie - TOTALPRX). Z pozostałej części ekstraktu wyizolowano tylko te białka, które były jonowo związane ze ścianą komórkową (CWPRX) i także metodą enzymatyczną z użyciem gwajakolu jako substratu sprawdzono ich aktywność.

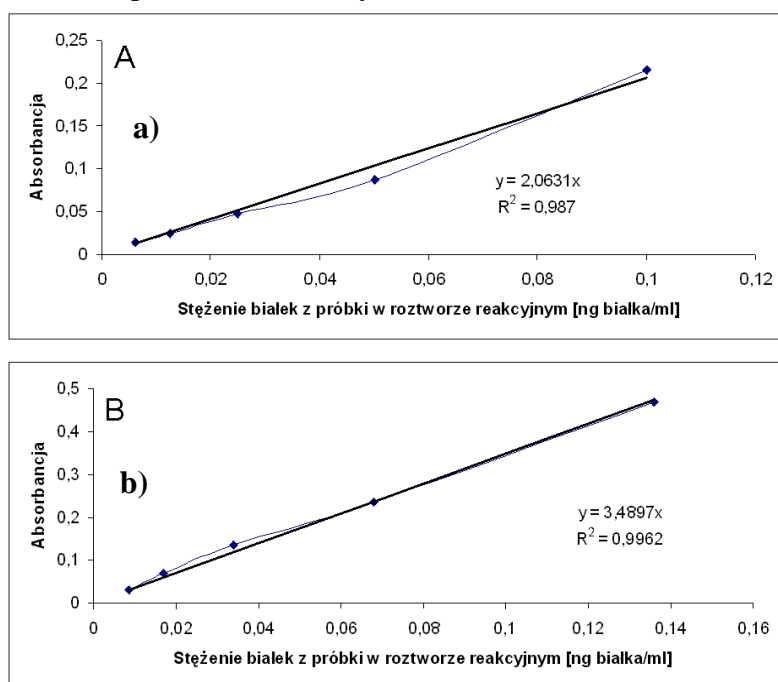


Fig. 53. Wydajność reakcji sprawdzającej poziom aktywności peroksydaz w materiale TOTALPRX (a) i CWPRX (b)

Pierwszym etapem było sprawdzenie poziomu aktywności enzymatycznej peroksydaz w zależności od rozcieńczenia wyizolowanego ekstraktu białkowego. Reakcja utleniania gwajakolu w obecności H_2O_2 okazała się być stabilna w szerokim zakresie rozcieńczenia ekstraktu białkowego (Fig. 53).

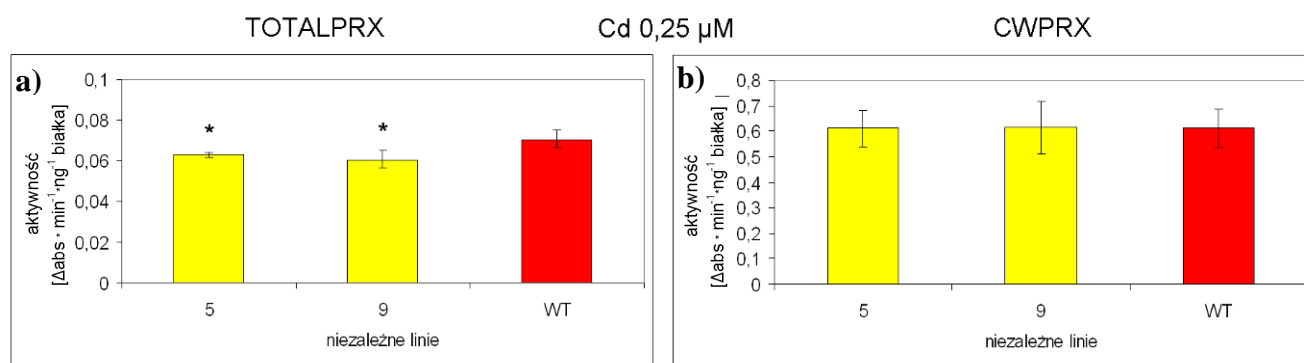


Fig. 54. Aktywność peroksydaz w próbkach zawierających ekstrakt białkowy (TOTALPRX) (a) oraz zwierających tylko białka jonowo związane ze ścianą komórkową (CWPRX) (b). Ekstrakt białkowy izolowano z 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linia 5 i 9 oraz typu dzikiego hodowanych w obecności 0,25 μM Cd przez 4 dni. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

Kolejno wykonano pomiar aktywności peroksydaz w ekstraktach białkowych (wszystkich białek i jonowo związanych) wyizolowanych z roślin hodowanych w obecności Cd oraz roślin rosnących w pożywce kontrolnej. Niewielkie obniżenie poziomu aktywności peroksydaz występowało w materiale pochodzącym z roślin z ekspresją *AtHMA4-F* rosnących w obecności Cd w próbkach TOTALPRX w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 54 a). W materiale CWPRX nie było żadnych różnic w aktywności peroksydaz pomiędzy roślinami transformowanymi a typu dzikiego (Fig. 54 b).

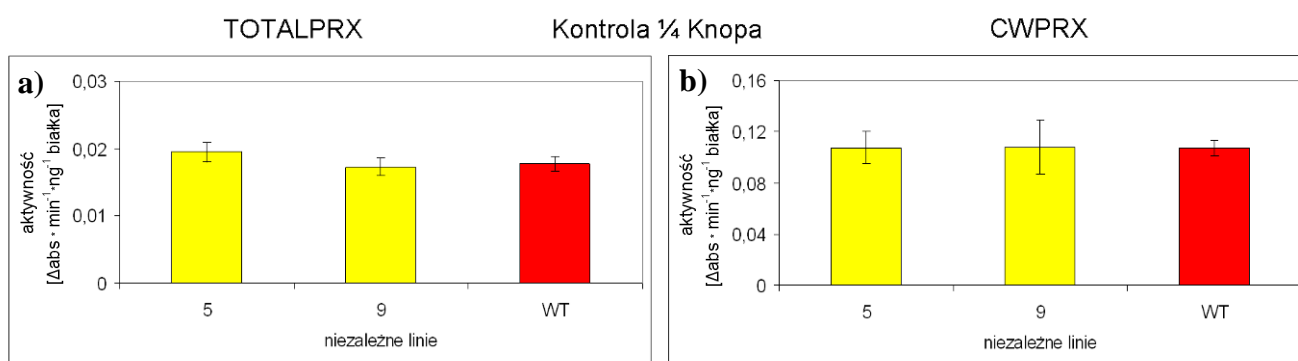


Fig. 55. Aktywność peroksydaz w próbkach zawierających ekstrakt białkowy (TOTALPRX) (a) oraz zwierających tylko białka jonowo związane ze ścianą komórkową (CWPRX) (b). Ekstrakt białkowy izolowano z 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* linia 5 i 9 oraz typu dzikiego hodowanych w warunkach kontrolnych. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

W materiale zawierającym ekstrakt białkowy (TOTALPRX) oraz zawierającym tylko białka jonowo związane ze ścianą komórkową (CWPRX) izolowanym z roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego hodowanych w warunkach kontrolnych nie było różnic w aktywności peroksydaz (Fig. 55).

Podsumowując, u roślin transformowanych hodowanych w obecności Cd aktywność peroksydaz w ekstrakcie białkowym (TOTALPRX) izolowanym z korzeni jest niższa niż u tytoniu typu dzikiego. Najprawdopodobniej wynik ten jest konsekwencją obniżonego stężenia Cd w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do typu dzikiego, co może świadczyć o mniejszym stresie oksydacyjnym w komórkach transformantów niż u typu dzikiego. Aktywność peroksydaz jonowo związanych ze ścianą komórkową nie różniła się u roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego.

4.9. Analiza akumulacji pierwiastków w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* poddanego ekspozycji na Cd – profil jonowy

Ekspresja *AtHMA4-F* w roślinach tytoniu poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd prowadzi do obniżenia pobierania Cd (oraz Zn) (Fig. 12 i 14), czemu towarzyszy wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za biosyntezę lignin (Fig. 46 i 47) oraz wzrost lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy pierwszą warstwą kory pierwotnej a epidermą (Fig. 50). Lignifikacja ściany komórkowej stanowi fizyczną barierę dla jonów metali, może zatem być przyczyną obserwowanego ograniczenia pobierania Cd i Zn. Nie można więc wykluczyć, iż zmiany te prowadzą także do obniżenia transportu radialnego w korzeniu innych pierwiastków przenoszonych wraz z wodą, a w efekcie ich pobierania przez korzeń. Aby to sprawdzić przeprowadzono analizę profilu jonowego korzeni roślin transformowanych i typu dzikiego poddanych ekspozycji na 0,25 μM Cd. Wykonano także analizę profilu jonowego w częściach nadziemnych badanych roślin, aby sprawdzić czy ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do zmiany dystrybucji pierwiastków pomiędzy korzeniem a pędem. Wyniki analizy profilu jonowego korzeni i pędów roślin z ekspresją *AtHMA4-F* oraz typu dzikiego przedstawiono na Fig. 56.

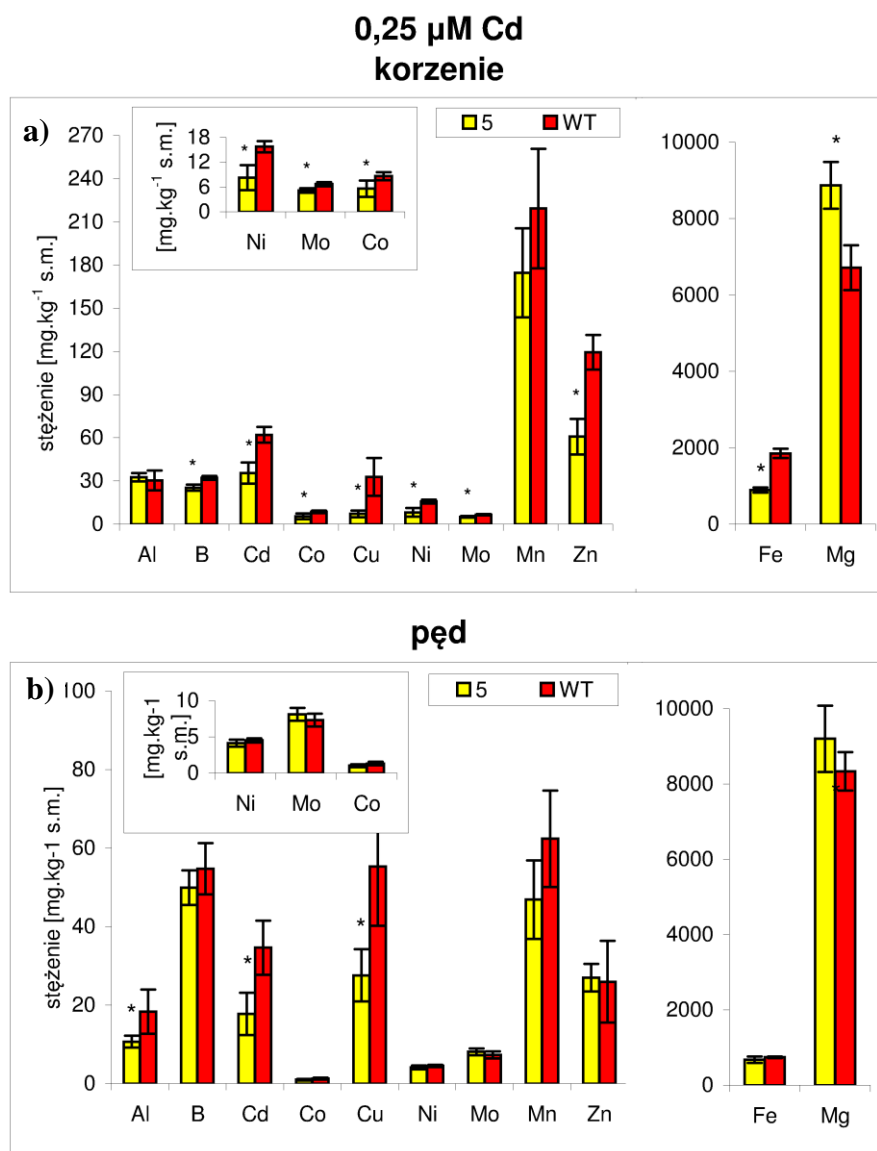


Fig. 56. Profil jonowy korzeni a) i pędów b) u 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linia 5) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd przez 4 dni. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego oznaczono gwiazdką.

W korzeniach roślin transgenicznych hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd w porównaniu do typu dzikiego występuje zmniejszone stężenie Zn, Cd (tak jak wcześniej pokazano, Fig 12 a-d) oraz B, Co, Cu, Ni, Mo, Fe oraz wzrost stężenia Mg (Fig. 56 a). Należy zaznaczyć, że sucha masa korzeni i pędów roślin transgenicznych była zbliżona do suchej masy roślin typu dzikiego. Wyniki analizy profilu jonowego w korzeniach sugerują obniżenie pobierania przez rośliny transgeniczne pierwiastków takich jak B, Co, Cu, Ni, Mo oraz Fe. Najbardziej prawdopodobną przyczyną ograniczenia pobierania tylu różnych pierwiastków jest bariera fizyczna, jaką jest silniej z lignifikowana ściana komórkowa pomiędzy epidermą a korą pierwotną u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* niż u typu dzikiego. Obecność z lignifikowanej ściany w tej części korzenia hamuje transport radialny wody i soli mineralnych.

W pędzie roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w stosunku do roślin typu dzikiego wystąpiło obniżenie stężenia Al, Cd, Cu (ok. 2-krotnie, Fig. 56 b). Poziom translokacji pierwiastków do pędu określono na podstawie współczynnika translokacji (TF - pokazanego jako stosunek stężenia danego pierwiastka w pędzie do stężenia w korzeniu). Okazało się, że współczynnik translokacji jest istotnie zwiększony dla Fe, Ni, Mo i Zn, przy czym można zaobserwować tendencję zwiększenia współczynnika translokacji dla Cu oraz obniżenia dla Al (Fig. 57).

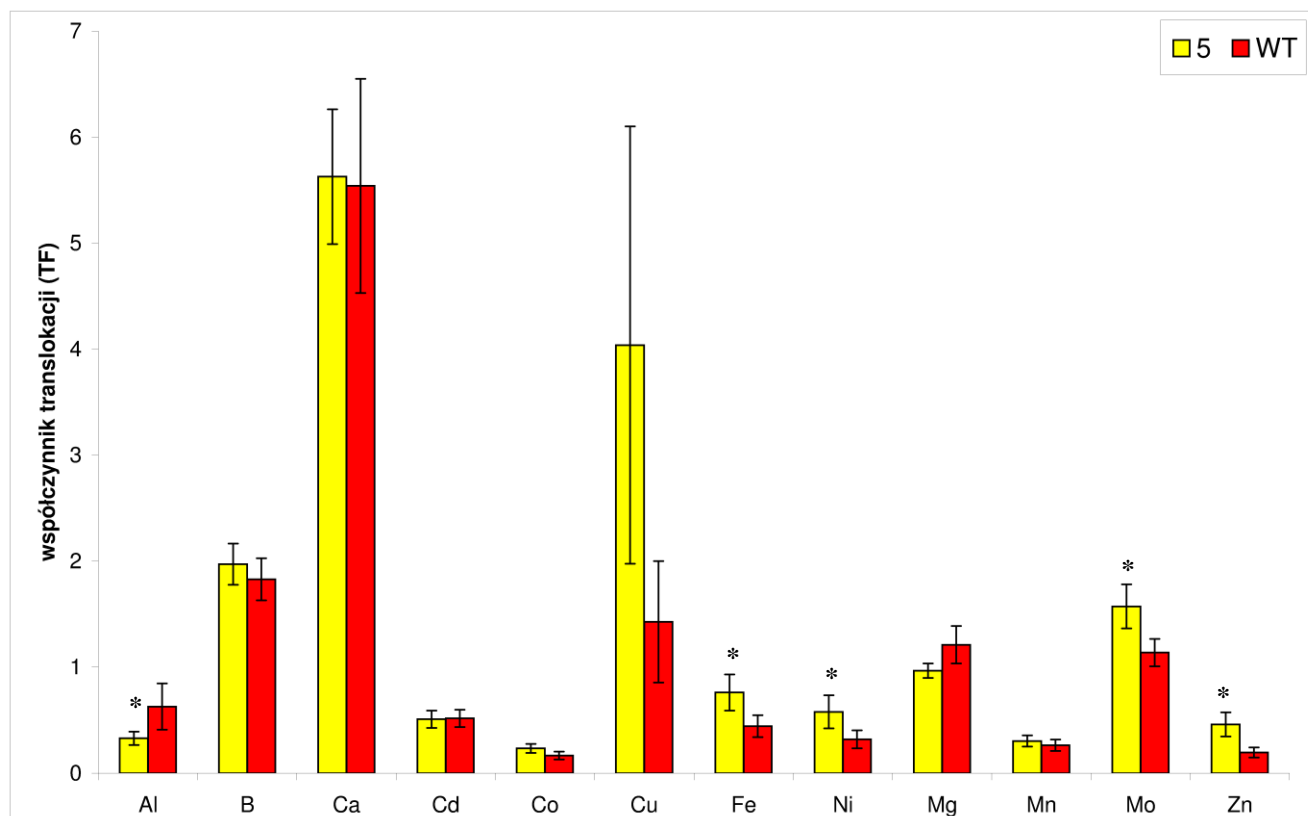


Fig. 57. Współczynnik translokacji (TF) u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linia 5) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w obecności 0,25 μ M Cd. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego, oznaczono gwiazdką.

W korzeniach roślin hodowanych w warunkach kontrolnych stężenie badanych pierwiastków było na zbliżonym poziomie w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego (Fig. 58). Jedynie stężenie Cu w pędzie było większe u roślin transformowanych niż u roślin typu dzikiego.

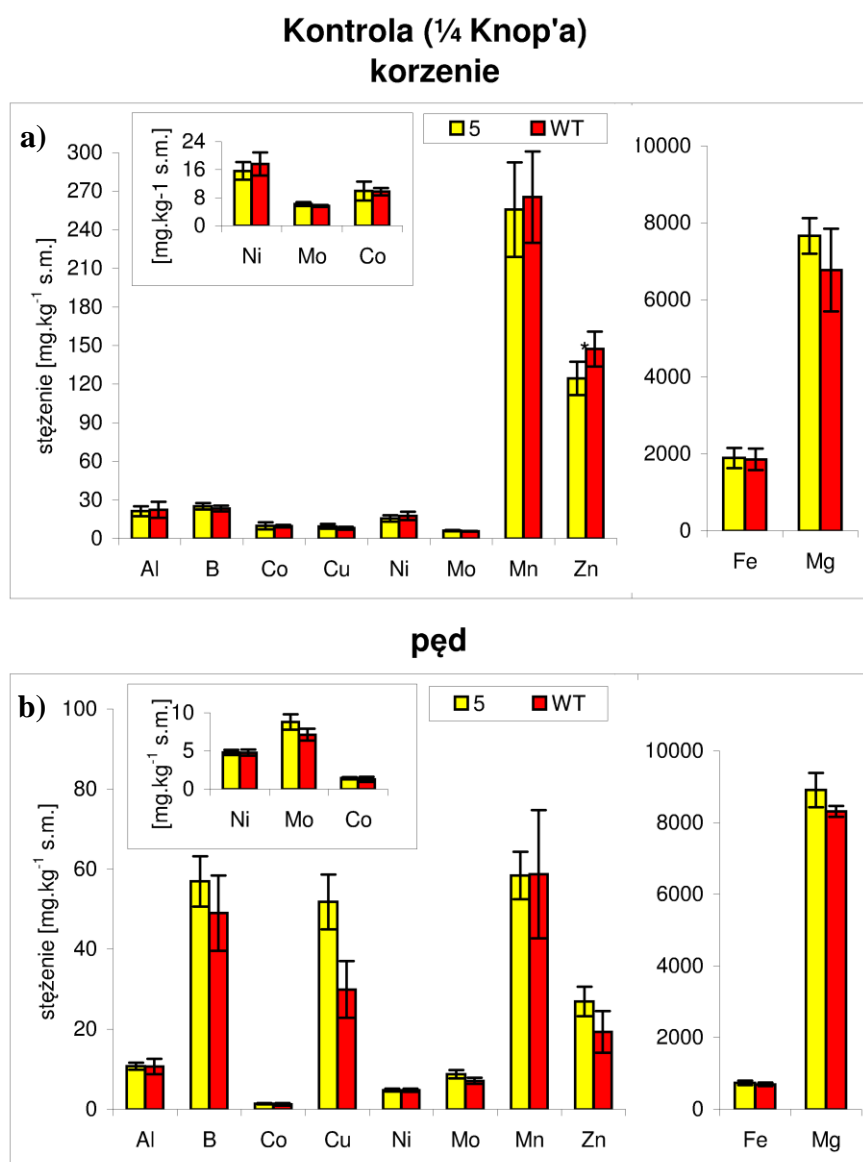


Fig. 58. Profil jonowy korzeni (a) i pędów (b) u 5-tygodniowych roślin z ekspresją *AtHMA4-F* (linia 5) oraz typu dzikiego (WT) hodowanych w warunkach kontrolnych bez dodatku Cd. Różnice istotne statystycznie ($P < 0.05$) w stosunku do typu dzikiego, oznaczono gwiazdką.

Podsumowując, w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanym w obecności Cd następuje wzrost poziomu lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną. Zahamowanie akumulacji Zn, Cd, B, Co, Cu, Ni, Mo i Fe w korzeniu stwierdzono jedynie w obecności Cd (Fig. 56 a; Fig. 58). Badania ekspresji genów tytoniowych, poziomu lignifikacji i obecności nadtlenu wodoru oraz profilu jonowego jednoznacznie wskazują, że przyczyną zahamowania pobierania Cd (oraz innych pierwiastków) u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* jest wzrost lignifikacji ściany komórkowej.

5. Dyskusja

Badania w ramach pracy doktorskiej prowadzono na roślinach tytoniu z ekspresją pełnej kopii genu *AtHMA4-F* i jego wariantów *AtHMA4-C* (koniec C białka *AtHMA4*) i *AtHMA4-T* (białko *AtHMA4* bez końca C). Gen *AtHMA4* pochodzi z *A. thaliana* i koduje transporter jonów Zn^{2+} oraz Cd^{2+} . Funkcją fizjologiczną *AtHMA4* jest udział w załadunku Zn i Cd do ksylemu oraz kontrola translokacji tych metali z korzeni do pędów (Hussain i inni, 2004; Verret i inni 2005; Williams i Mills, 2005). Uważa się, iż *AtHMA4* może również odgrywać rolę w detoksykacji obu metali poprzez usuwanie ich nadmiaru poza metabolicznie aktywne obszary komórki, do apoplastu (Williams i Mills, 2005; Hanikenne i inni, 2008). *AtHMA4* może mieć zatem potencjalne zastosowanie w biotechnologii do modyfikacji genetycznej roślin dla zwiększenia poziomu translokacji Zn lub Cd z korzenia do pędu oraz do zwiększenia poziomu tolerancji obu metali. Tego typu modyfikacje mogą służyć na przykład dla celów fitoremediacji.

Badania w ramach pracy doktorskiej wykazały jednak, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu tylko w niewielkim stopniu prowadzi do wzrostu poziomu translokacji Zn oraz Cd do pędu. Okazało się też, że modyfikacja translokacji (intensyfikacja lub obniżenie) zależy od stężenia metali w podłożu. Jednocześnie, pomimo że *AtHMA4* nie pełni roli w pobieraniu metali, u roślin transformowanych obserwowano ograniczenie pobierania Cd w niektórych wariantach składu pożywki, a także Zn. W wyniku ekspresji *AtHMA4-F* w tytoniu nastąpiło także obniżenie poziomu tolerancji na Zn oraz wzrost poziomu tolerancji na Cd w porównaniu do roślin typu dzikiego. Obserwowane w roślinach transgenicznym modyfikacje akumulacji Zn i Cd były jedynie w bardzo niewielkim stopniu zgodne z oczekiwanymi (wynikającymi ze znanej funkcji, jaką białko *AtHMA4* pełni w roślinie macierzystej). Sugerowały one, że przyczyną powstawania takich zmian jest indukcja w tytoniu endogennych mechanizmów w wyniku ekspresji *AtHMA4*. Dalsze badania wykazały, że ektopowa ekspresja transgenu w tytoniu skutkuje zmianami stężenia Zn i Cd w układzie apoplast/symplast (wzrost stężenia Zn i Cd w apoplaście i obniżenie w symplaście na skutek eksportu tych metali poza komórkę), a także zmianami ich dystrybucji w tkankach korzeni i liści. Kolejne eksperymenty ujawniły w transformantach znaczące modyfikacje wzoru ekspresji genów, a także procesów biochemicznych. Biorąc pod uwagę całość wyników, niniejsza praca pozwala rzucić nowe światło na rodzaje procesów indukowanych w tytoniu z ekspresją *AtHMA4* lub jego wariantów, decydujących o rodzaju i zakresie zmian w roślinie transformowanej, zatem o fenotypie transformanta.

5.1. Ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do zmiany poziomu pobierania i translokacji Zn z korzenia do pędu jedynie w wąskim zakresie stężeń w pożywce

Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do wzrostu translokacji Zn do pędu, jednak tylko przy określonym stężeniu Zn w pożywce. Wzrost stężenia Zn w częściach nadziemnych, wynikający z bardziej efektywnej translokacji, stwierdzono u roślin z ekspresją 35S:*AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na 10 μ M Zn (Fig. 10 c i d). Dla porównania nadekspresja *AtHMA4* pod promotorem CaMV35S w *A. thaliana* spowodowała zarówno wzrost translokacji, jak i pobierania Zn (Verret i inni, 2004). Widać więc, że w odróżnieniu od roślin *Arabidopsis* z nadekspresją *AtHMA4*, ekspresja tego genu w tytoniu nie prowadzi do zwiększenia (kilkukrotnego) translokacji Zn do pędu. U roślin tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* większy poziom translokacji Zn do pędu występuje także przy ekspozycji na 100 μ M Zn w pożywce (Fig. 11), jednak w takich warunkach następuje ograniczenie pobierania Zn, a przez to obniżenie jego stężenia w korzeniach (Fig. 10 g). W związku z tym, pomimo zwiększenia translokacji Zn do pędu, wzrost jego stężenia w pędach transgenicznego tytoniu (w porównaniu do roślin typu dzikiego) jest jedynie niewielki (Fig. 10 g i h). U transformantów rosnących w obecności 0,5, 50 i 200 μ M Zn nie zanotowano zmian w poziomie translokacji tego metalu do pędu (w porównaniu do typu dzikiego), zatem zmiany dystrybucji Zn korzeń/pęd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* są zależne od stężenia Zn w pożywce. Podobnie Barabasz i inni (2010) wykazała, że w tytoniu z ekspresją *AhHMA4* z *A. halleri*, translokacja Zn do pędu oraz modyfikacja pobierania tego pierwiastka jest zależna od jego stężenia w pożywce.

U tytoniu z ekspresją *AhHMA4*, tak jak u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, stężenie Zn w całych pędach pozostawało na poziomie wartości dla roślin nietransformowanych. Bardziej szczegółowe badania pokazały jednak, wzrost stężenia Zn w młodych (górnym) liściach roślin hodowanych długoterminowo (5 tygodni) w obecności niskiego stężenia Zn (0,4 μ M) w pożywce. Wynik taki wskazuje, że skutki ekspresji *HMA4* zależą nie tylko od warunków zaopatrzenia roślin w Zn, ale także fazy rozwojowej. Warto zaznaczyć, że w badaniach Barabasz i inni (2010) ekspresja *AhHMA4* zachodziła pod promotorem endogennym, natomiast w niniejszej pracy doktorskiej pod promotorem konstytutywnym (CaMV35s). Z kolei ekspresja *AhHMA4* (pod własnym promotorem) w pomidorze spowodowała wzrost stężenia Zn w pędach, wskazując na wzrost translokacji tego metalu do części nadziemnych w porównaniu do roślin typu dzikiego, ale tylko u roślin rosnących w obecności 10 μ M Zn w pożywce (Barabasz i inni, 2012). Badania wskazują, że wzrost translokacji Zn z korzenia do pędu u roślin z ekspresją *HMA4* (zarówno z *A. thaliana* jak też z *A. halleri*) zależy zarówno od gatunku użytego do transformacji (tła genetycznego), jak też od poziomu Zn w podłożu. Zatem można sądzić, że aby zwiększyć poziom

stężenia Zn w pędzie, konieczne byłoby wprowadzenie nie tylko odpowiedniego mechanizmu umożliwiającego wzrost translokacji Zn, ale także zwiększającego jego pobieranie.

HMA2 jest funkcjonalnym odpowiednikiem HMA4 w *A. thaliana*, zatem dopiero mutacja obu genów prowadzi do zahamowania translokacji Zn do pędów (Hussain i inni, 2004). TaHMA2 pełni w pszenicy (*Triticum aestivum*) rolę podobną do tej, jaką pełni HMA2 i HMA4 w *Arabidopsis*. Tan i inni (2013) eksprimowali TaHMA2 w ryżu (*Oryza sativa*), tytoniu (*N. tabacum*) i pszenicy. Stwierdzono znaczący wzrost translokacji Zn z korzenia do pędu oraz zwiększenie stężenia Zn w liściach, jednak tylko w wyniku ekspresji TaHMA2 w ryżu, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu Zn w korzeniu. W tytoniu jak i w pszenicy zmiany translokacji oraz stężenia Zn były niewielkie lub w ogóle nie występowały. Należy zaznaczyć, że doświadczenia były wykonywane na pożywce Hoagland'a (tytoń, pszenica; 0,05 ppm Zn) i standardowej pożywce dla hodowli ryżu. Niestety badania te nie zostały przeprowadzone w obecności różnych stężeń Zn w pożywce. Można jednak na ich podstawie wskazać, jak odmienne efekty ma ekspresja tego samego genu w różnych roślinach (Tan i inni, 2013).

Podsumowując, w porównaniu do roślin typu dzikiego, zmiany w pobieraniu, translokacji z korzeni do pędu oraz akumulacji Zn i Cd w pędzie u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zależne są od stężenia Zn bądź Cd w pożywce. Podobne rezultaty zanotowano dla tytoniu z ekspresją *AtCAX2* i *AtCAX4* (transport wapnia do wnętrza wakuoli), *AtECA3* (transport wapnia poza cytoplazmę do aparatu Golgiego) i *HvHMA2* (HMA2 z *Hordeum vulgare*) (Korenkov i inni, 2007; Barabasz i inni, 2011 i 2013). Skomplikowana sieć zależności pomiędzy skutkami aktywności wprowadzonego białka, a mechanizmami odpowiedzialnymi za utrzymanie homeostazy metali w roślinie hodowanej w warunkach deficytu, optymalnego zaopatrzenia lub nadmiaru metalu sprawiają, że przewidywanie skutków transformacji jest niezwykle trudne, co także pokazuje jak istotna dla właściwej oceny przydatności modyfikacji dla potrzeb biotechnologii jest analiza roślin w różnym zakresie profilu jonowego.

5.2. Ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do zmiany poziomu tolerancji na Zn i Cd

Ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu doprowadziła do obniżenia poziomu tolerancji na Zn w stosunku do roślin typu dzikiego. Objawem obniżenia tolerancji było pojawienie się licznych nekroz u roślin transformowanych hodowanych w obecności 100 μ M i 200 μ M Zn, czego nie obserwowano u roślin typu dzikiego (Fig. 28 a-d typ dziki, e-h tytoń z ekspresją *AtHMA4-F*). Zwiększonej liczbie nekroz u transformantów nie towarzyszy jednak wyższe stężenie Zn w pędach (Fig. 10 h, j). *AtHMA4* odpowiada za eksport Zn poza komórkę do apoplastu, a ponieważ gen *AtHMA4-F* wprowadzono do tytoniu pod konstytutywnym promotorem (CaMV35S), zwiększony eksport Zn zachodzi we wszystkich komórkach roślin transformowanych, a co za tym idzie

w tkankach i organach. Brak różnic w stężeniu Zn w liściach pomiędzy roślinami transformowanymi, a typu dzikiego sugeruje, że przyczyną powstawania licznych nekroz na wszystkich liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* może być zmiana dystrybucji Zn pomiędzy apoplastem i symplastem prowadząca do zmian w dystrybucji tego metalu w tkankach. Blaszka liściowa zbudowana jest z tkanki okrywającej, miękiszu palisadowego, gąbczastego oraz tkanki przewodzącej. Pomimo strukturalnego podobieństwa komórek miękiszu palisadowego i gąbczastego w obrębie całego liścia, istnieje wiele przesłanek wskazujących na zróżnicowanie fizjologiczne i funkcjonalne komórek w każdej z tych tkanek. Rozwój nekroz (w wyniku lokalnego zamierania komórek) w liściach tytoniu poddanego ekspozycji na wysokie stężenia Zn może być przejawem tego funkcjonalnego zróżnicowania pozornie jednorodnych tkanek. Występowanie zróżnicowania w poziomie akumulacji pierwiastków w obrębie komórek jednej tkanki zostało pokazane dla mezofilu u roślin *N. cearulescence*, gdzie zidentyfikowano komórki, akumulujące znacznie większe ilości Zn i Cd niż pozostałe komórki tej samej tkanki (Küpper i inni, 2000). Akumulacja dużych ilości Zn, Cd lub innych pierwiastków w pojedynczych komórkach może służyć ochronie komórek sąsiadujących przed ich nadmiarem, zatem tkanki jako całości.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zaobserwowano podwyższony poziom tolerancji na Cd w porównaniu do roślin typu dzikiego. Taki wynik może być rezultatem niewielkiego obniżenia stężenia Cd w pędach roślin transformowanych oraz aktywności *AtHMA4-F* prowadzącej do zwiększenia transportu Cd do apoplastu. Akumulacja Cd w ścianie komórkowej zmniejszałaby jego toksyczny wpływ na ważne procesy metaboliczne wewnątrz komórki. Wiadomo, że sekwestracja Cd w ścianie komórkowej jest ważnym mechanizmem tolerancji tego metalu w roślinach (Krzesłowska, 2011). Podobnie wzrost poziomu tolerancji na Cd zaobserwowano u *A. thaliana* z ekspresją *AhHMA4* (zarówno pod endogennym jak i konstytutywnym promotorem), pomimo braku różnic w poziomie akumulacji tego pierwiastka pomiędzy transformantami a roślinami typu dzikiego (Verret i inni, 2004; Hanikenne i inni, 2008). Z kolei ekspresja *TaHMA2* (genu o dużym stopniu homologii do *AtHMA4*) w tytoniu spowodowała obniżenie poziomu tolerancji na Cd, chociaż stężenie tego pierwiastka nie różniło się pomiędzy roślinami typu dzikiego i transformantami (Tan i inni, 2013). Powyższe wyniki wskazują na to, że modyfikacja tolerancji na Cd w wyniku ekspresji *HMA4* lub *HMA2* zależy w dużej mierze od rośliny użytej do transformacji. Być może pojemność apoplastu dla kompleksowania Cd jest na tyle różna, że prowadzi do odmiennych efektów.

5.3. Przeladowanie apoplastu cynkiem u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* prowadzi do zaburzenia homeostazy tego pierwiastka w korzeniach i pędach

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn nastąpiło obniżenie pobierania Zn (choć *AtHMA4-F* nie bierze udziału w pobieraniu Zn) przy jednoczesnym wzroście jego translokacji do pędu, sprawiając, że stężenie Zn w częściach nadziemnych roślin transformowanych pozostało na poziomie zbliżonym do roślin typu dzikiego (Fig. 10 g i h). Rośliny transgeniczne okazały się jednak bardziej wrażliwe na Zn i w obecności 100 μM Zn wzrosła u nich ilość nekroz. Wiadomo, że nadmiar Zn może być akumulowany w ścianie komórkowej, co stanowi ważny element procesu detoksykacji tego pierwiastka (Tramczyńska i inni, 2010; Krzesłowska, 2011). Eksport nadmiaru Zn i Cd poza cytoplazmę jest jednym z mechanizmów mogących zwiększać poziom tolerancji. Geny *AhHMA4* oraz *NcHMA4* ulegają ekspresji w roślinach macierzystych (*A. halleri*, *N. caerulea*) nie tylko w wiązkach przewodzących korzenia, gdzie mogą odpowiadać za kontrolę translokacji Zn i Cd do pędu, ale także w obrębie komórek mezofilu blaszek liściowych. Taka lokalizacja ekspresji u roślin akumulujących duże ilości Zn i Cd w pędach (toksyczne dla innych roślin) sugeruje, że HMA4 bierze udział w detoksykacji Zn i Cd poprzez eksport ich nadmiaru poza komórkę (Papoyian i Kochian, 2004; Hannikene i inni, 2008).

Zwiększony eksport Zn poza komórkę w korzeniach i liściach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* może jednak prowadzić do istotnych zmian stężenia Zn w jej wnętrzu i w ścianie komórkowej prowadząc do uruchomienia procesów przywrócenia homeostazy Zn. Z tego powodu w dalszej części niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono badania lokalizacji Zn w obrębie komórek, tkanek i organów. W pierwszej kolejności przeprowadzono badania w celu określenia lokalizacji i poziomu stężenia Zn w różnych kompartmentach komórek z różnych tkanek korzeni i liści używając metody mikroanalizy rentgenowskiej. Aby uniknąć przemieszczania mikroelementów wewnątrz komórek, przygotowanie preparatów do mikroanalizy odbywało się z użyciem metod mrozeniowych (High-pressure freezing i Freeze substitution). Słabą stroną stosowanej w pracy procedury przygotowania preparatów był proces zatapiania w żywicy Spura oraz utwardzanie preparatów, podczas których może nastąpić wypłukanie części metali.

Wiadomo, że Zn występuje w komórce przede wszystkim w postaci słabo związanej (Broadley i inni, 2007), jednak zastosowana metoda mikroanalizy rentgenowskiej nie pozwoliła na zbadanie jego stężenia w tej formie. Możliwa była jedynie detekcja Zn występującego w nierozpuszczalnych złogach fosforanowo-siarkowych w komórkach korzeni pomiędzy epidermą a korą pierwotną roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn (Fig. 32). Należy zaznaczyć, że nie jest znany mechanizm powstawania trudno rozpuszczalnych złogów zawierających Zn, jednak analizy występowania złogów zawierających metale także mogą dostarczyć pewnych informacji

ważnych dla oceny badanych zjawisk. Van Belleghem i inni (2007) stosując takie same metody badawcze jak w niniejszej pracy, wykryli obecność Cd związanego ze złogami siarkowo-fosforanowymi w kompartmentach różnych komórek korzeni *A. thaliana*, co pozwoliło im na wysunięcie hipotez o mechanizmach detoksykacji Cd. Badania w ramach pracy doktorskiej były wzorowane i realizowane pod nadzorem współautora publikacji van Belleghem i inni (2007) w tym samym laboratorium na Uniwersytecie w Gandawie.

W wyniku badań przeprowadzonych w ramach doktoratu, obecność Zn wykryto w złogach na terenie ściany komórkowej epidermy i pierwszej warstwy kory pierwotnej u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*. Nie wykazano natomiast obecności Zn w złogach występujących wewnątrz komórki. U roślin typu dzikiego Zn wykryto w złogach wewnątrz komórki, natomiast nie stwierdzono jego obecności w złogach w ścianach komórkowych tej warstwy (Fig. 32 a i b). Takie wyniki wskazują, że ekspresja *AtHMA4-F* spowodowała przeładowanie apoplastu cynkiem, co sugeruje obniżenie jego stężenia we wnętrzu komórek. Badania z wykorzystaniem mikroanalizy rentgenowskiej nie wskazały jednak, jaka jest lokalizacja komórkowa Zn w pozostałych tkankach korzeni oraz w liściach.

Aby określić lokalizację Zn we wszystkich tkankach korzeni oraz w liściach, wykonano trzy dodatkowe badania wykorzystując metody fluorescencyjne (oparte o Zinpyr-1) oraz analizy stężenia Zn w protoplastach i płynie apoplastycznym (rozdział 4.4.2). Wykazano, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* następuje obniżenie stężenia Zn wewnątrz komórki (Fig. 33 i 34b) oraz wzrost stężenia Zn w apoplaście (Fig. 35). Ekspresja *AhHMA4* (pod własnym promotorem) w pomidorze także doprowadziła do wzrostu stężenia Zn w apoplaście (Barabasz i inni, 2012). Podobnie u tytoniu z ekspresją *HvHMA2* (pod promotorem CaMV35s) analiza stężenia Zn w płynie apoplastycznym wskazała jego wzrost w stosunku do roślin typu dzikiego (Barabasz i inni, 2013). Ekspresja genów kodujących białka przenoszące Zn poza komórkę, jakimi są *HMA4* lub *HMA2* prowadzi do zmiany w stężeniu Zn pomiędzy symplastem a apoplastem. Badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej pokazały także, że ekspresja *AtHMA4-F* doprowadziła do zmiany w dystrybucji Zn pomiędzy komórkami w różnych tkankach korzeni i liści.

a) Korzenie

W korzeniach tytoniu typu dzikiego, Zn zlokalizowany był przede wszystkim we wnętrzu komórek (Fig. 36 a i c). Największa ilość Zn zgromadzona była w walcu osiowym (Fig. 36 a2 i c2). Natomiast u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* Zn wykryto przede wszystkim w obrębie ścian komórkowych we wszystkich tkankach korzeni, nie zaobserwowano natomiast akumulacji Zn w walcu osiowym (Fig. 36 b i d). Podobny rezultat otrzymano u roślin *A. thaliana* z ekspresją *AhHMA4* (Hanikenne i inni, 2008). Ekspresja *AhHMA4* prowadziła u *A. thaliana* do wzrostu

stężenia Zn w obrębie naczyń ksylemu i ścian komórkowych, Zn nie był akumulowany w dużych ilościach wewnątrz komórek miękiszu ksylemowego. Dla porównania u roślin nietransformowanych obserwowano akumulację Zn w obrębie komórek miękiszu ksylemowego (Hanikenne i inni, 2008). Wyniki te obrazują, w jak dużym stopniu ekspresja *HMA4* wpływa na dystrybucję Zn w komórkach wszystkich tkanek korzeni. Konsekwencją tak istotnej zmiany lokalizacji Zn w tkankach i komórkach korzeni, szczególnie w walcu osiowym, jest z pewnością indukcja procesów na poziomie molekularnym mających na celu przywrócenie równowagi.

W badaniach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykazano, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μM Zn ograniczone zostało pobieranie Zn. Prosty wyjaśnieniem tego zjawiska może być zwiększony eksport Zn wynikający z aktywności AtHMA4 w komórkach epidermy korzeni. Jest jednak mało prawdopodobne, aby Zn, który jest eksportowany poza epidermę mógł łatwo wydostać się do pożywki. Wynika to ze specyfiki ściany komórkowej, w której dwuwartościowe jony metali wiążą się z wolnymi grupami karboksylowymi pektyn występującymi w ścianie komórkowej oraz z kierunku strumienia pobieranej przez korzeń wody, płynącej do walca osiowego. Ograniczenie pobierania Zn u roślin transformowanych może mieć jednak inne wyjaśnienie. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* obserwujemy przeładowanie apoplastu Zn we wszystkich kolejnych tkankach korzenia. Ściana komórkowa jest pierwszym miejscem odbierania sygnałów o nadmiarze Zn. Wzrost jego stężenia w apoplaście w stosunku do stężenia tego pierwiastka w symplasmie może być sygnałem obecności nadmiaru Zn. W efekcie mogło nastąpić uruchomienie mechanizmów prowadzących do obniżenia pobierania Zn. Aby to sprawdzić, należałoby wykonać badanie poziomu ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w pobieranie tego metalu.

Jednocześnie przeładowanie apoplastu cynkiem może wpływać na procesy biochemiczne ściany komórkowej oraz może prowadzić do zmiany jej struktury. Na przykład w pomidorze wraz ze wzrostem stężenia Zn w apoplaście następuje zwiększenie ekspresji genu *LePME1*- kodującego metyloesterazę pektyn (Pelloux i inni, 2007). Co więcej Barabasz i inni (2012) pokazała, że ekspresja *AhHMA4* (pod własnym promotorem) w pomidorze prowadzi do wzrostu stężenia Zn w apoplaście oraz do zwiększonej ekspresji *LePME1* w liściach w stosunku do roślin typu dzikiego hodowanych w obecności 10 μM Zn. Wiadomo, że aktywność metyloesterazy prowadzi do wytworzenia w strukturze pektyn niezestryfikowanych grup karboksylowych, które mogą wiązać się z jonami takimi jak Ca^{2+} , Zn^{2+} lub Hg^{+} , dzięki czemu mogą zwiększać możliwość ich akumulacji w ścianie komórkowej jednocześnie zwiększając jej sztywność (Heidenreich i inni, 2001; Hassinen i inni, 2007). W związku z powyższym możliwe, że wzrost stężenia Zn w apoplaście komórek korzeni u roślin transformowanych mógłby prowadzić zarówno do zwiększania potencjału sorpcyjnego metali dwuwartościowych (takich jak Zn) w ścianie

komórkowej, jak i wzrostu jej sztywności (np. poprzez wzrost aktywności metylotransferaz). W rezultacie u transformantów w mechaniczny sposób mogłoby dochodzić do zmniejszenia poziom transportu Zn w apoplacie, a w konsekwencji do ograniczenia pobierania tego pierwiastka przez roślinę.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności 100 μ M Zn następuje wzrost translokacji Zn z korzenia do pędu (Fig. 36 e2 i f2). Zakładano, że wzrost translokacji Zn do pędu u roślin transformowanych jest efektem usprawnienia mechanizmu załadowania Zn do ksylemu w wyniku aktywności w tytoniu transgenicznego białka AtHMA4. Wzrost stężenia Zn w ścianach komórkowych ksylemu oraz niższy poziom Zn wewnątrz komórek miękiszu ksylemowego u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* wskazuje, że wzrost translokacji Zn spowodowany jest stałym przeładowaniem apoplastu cynkiem, prowadzącym prawdopodobnie do zniszczenia naturalnego mechanizmu akumulacji tego metalu w miękiszu ksylemowym i dalej kontrolowanego załadunku Zn do naczyń (w czym biorą właśnie udział komórki miękiszu ksylemowego). Co ciekawe, Sinclair i inni (2007) pokazał, że w roślinach *A. thaliana* z mutacją *hma2hma4*, (która powoduje ograniczenie eksportu Zn z miękiszu ksylemowego poza komórkę, a co za tym idzie zmniejszenie zdolności do translokacji Zn do pędu), następuje wzrost akumulacji Zn w walcu osiowym. U roślin *A. thaliana* typu dzikiego obserwuje się wysokie stężenie Zn w obrębie apoplastu (ścian komórkowych) (Sinclair i inni, 2007; Hanikenne i inni, 2008).

HMA4 odpowiada w roślinie za kontrolę załadunku Zn do ksylemu (Mills i inni, 2003; 2005; Williams i Mills, 2004; Verret i inni, 2004). Celem transformacji tytoniu genem *HMA4* było zwiększenie translokacji Zn/Cd z korzeni do pędu. Niestety, wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, jak i wyniki badań w innych gatunkach roślin z ekspresją genów homologicznych do *AtHMA4* (Hanikenne i inni, 2008, Barabasz i inni, 2012, 2013) wskazują, że w wyniku aktywności wprowadzonego białka, następuje zaburzenie równowagi w stężeniu Zn pomiędzy apoplastem i symplastem w tkankach korzeni roślin transformowanych. Wprowadzenie egzogennej HMA4 do rośliny prowadzi w transformancie do indukcji mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę równowagi jonowej na poziomie komórki w różnych tkankach. Każda zmiana w stężeniu pierwiastka w organach, tkankach i komórkach będzie wiązać się z uruchomieniem mechanizmów mających na celu przywrócenie zaburzonej równowagi w stężeniu pierwiastków w komórce. Zatem indukcja endogennych mechanizmów utrzymania homeostazy metali jest kluczowym (choć trudnym do przewidzenia) czynnikiem determinującym zmiany w ich pobieraniu, akumulacji i dystrybucji w transformowanej roślinie. Zależności te stoją prawdopodobnie także za obserwowanymi u transformantów modyfikacjami akumulacji/dystrybucji Zn zależnymi od stężenia tego metalu w pożywce. Stawia to pod znakiem zapytania efektywne wykorzystanie genu *HMA4* do transformacji dla potrzeb biotechnologii.

Warta odnotowania jest praca teoretyczna Claus i inni (2012), w której do modelowania transportu Zn w korzeniu wykorzystano liczne współczynniki fizyczne takie jak: geometria korzenia, prędkość przepływu wody, opór komórek i ścian komórkowych, dyfuzję, wpływ transpiracji oraz aktywne pobieranie Zn poprzez białka z rodziny ZIP wraz z regulacją ich ekspresji oraz wpływ aktywności HMA4 na poziom załadowania ksylemu Zn. Podejście to miało wskazać mechanizmy odpowiadające za kontrolę transportu Zn w korzeniu. Okazało się, że modelowy układ występowania Zn na przekroju poprzecznym korzeni to rosnący do środka gradient stężenia tego pierwiastka z maksimum w walcu osiowym. W niniejszej pracy badania z użyciem Zinpyr-1 potwierdziły ten obraz dystrybucji Zn w korzeniu u tytoniu typu dzikiego (Fig. 36 a i c). Zmiana parametrów modelu symulująca 4-krotny wzrost ekspresji HMA4 prowadziła do zniszczenia gradientu i wyrównania poziomu akumulacji Zn w obrębie wszystkich tkanek korzenia. Wyniki badań tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (Fig. 36, rozdział 4.4.3.1) są zgodne z przedstawionym przez Clausa i innych (2012) modelem. Wprowadzenie transgenu jak i 4-krotne zwiększenie aktywności HMA4 w modelu nie prowadziło do wzrostu poziomu translokacji Zn do pędu (Claus i inni, 2012).

b) Liście

Badania stężenia i lokalizacji Zn w liściach roślin transformowanych pokazały, że ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do zmiany dystrybucji Zn w obrębie tkanek blaszki liściowej. Przy tym samym stężeniu Zn w pożywce, u roślin typu dzikiego Zn jest akumulowany preferencyjnie wewnątrz komórek miękiszu palisadowego (Fig. 38 a i a1), natomiast u roślin transformowanych taka akumulacja nie ma miejsca (Fig. 38 b i b1). W tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanym w obecności 100 μM Zn, stwierdzono bardzo wysokie stężenie tego pierwiastka w nekrozach pojawiających się w blaszce liściowej. Podobną lokalizację Zn w obszarach nekrotycznych zaobserwowano u roślin typu dzikiego, ale dopiero, gdy rośliny hodowano w obecności 200 μM Zn (Fig. 38 e). Dla porównania, akumulację Cd w obrębie pojawiających się nekroz na liściach *N. caerulea* uznano za bezpośrednią przyczynę ich powstania (Cosio i inni, 2005).

Ważnym osiągnięciem pracy było wykazanie, że wspólną cechą towarzyszącą pojawianiu się nekroz u roślin transgeniczných w obecności 100 μM Zn, zaś u roślin typu dzikiego dopiero przy 200 μM Zn – było to samo stężenie Zn w płynie apoplastycznym (rozdział 4.4.3.3. i Fig. 10 h i j). Na tej podstawie oraz w oparciu o wyniki badań lokalizacji i dystrybucji Zn w komórkach i tkankach u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* i typu dzikiego można wskazać na możliwy mechanizm powstawania nekroz:

- Ekspresja *AtHMA4-F* prowadzi do wzrostu stężenia Zn w ścianie komórkowej liści, co może stanowić sygnał „alarmowy” dla komórki, informujący o wysokim poziomie tego pierwiastka w otoczeniu. Niewiele wiadomo na temat mechanizmów kontroli poziomu Zn w apoplacie

roślin oraz procesach przekazywania sygnału o jego podwyższonym stężeniu do wnętrza komórki. Jednak na przykład dla Mn wykazano, że poziom jego stężenia w apoplacie jest wyznacznikiem poziomu tolerancji na ten pierwiastek. Stwierdzono, że pomimo niewielkich ilości Mn w apoplacie, w porównaniu do stężenia całkowitego, to właśnie wzrost apoplastycznego stężenia Mn jest odpowiedzialny za wywołanie odpowiedzi rośliny związanej z możliwą toksycznością (Fecht-Christoffers i inni, 2006). Podobnie stężenie Fe w apoplacie wpływa na apoplastyczne stężenie nikotianaminy i kontrolę homeostazy Fe w komórce (Cassin i inni, 2009).

- W konsekwencji powstania sygnału "alarmowego" wynikającego z przeładowania apoplastu Zn, aby uniknąć zagrożenia wynikającego z nadmiaru Zn w obrębie całej blaszki liściowej, uruchamiane są procesy gromadzenia Zn w specyficznych obszarach liści. Akumulacja dużych ilości Zn tylko w pewnych obszarach blaszki liściowej pozwala na ochronę pozostałej fotosyntetycznie aktywnej tkanki. Nie wiadomo jednak, jaki proces jest odpowiedzialny za zróżnicowanie pozornie jednorodnej tkanki na obszary o różnej zdolności do akumulacji Zn oraz jakie mechanizmy są uruchamiane w tych komórkach. Odpowiedzi na oba pytania będą z pewnością przedmiotem dalszych badań.
- Jeżeli stężenie Zn będzie stale wzrastać jedynie lokalnie w obrębie grup komórek, dojdzie do przekroczenia granicy możliwości detoksykacji Zn, śmierci komórek i powstania nekrozy. Powstawanie nekroz mogłoby stanowić istotny problem, gdyż zgromadzony w zamierających komórkach nadmiar Zn mógłby zostać uwolniony w obrębie blaszki liściowej. Rozwiązanie, które chroni tytoń przed taką sytuacją to następujący wraz z powstawaniem nekrozy wzrost lignifikacji ścian komórkowych (Fig. 39). Wysycane ligninami ściany komórkowe stanowią barierę dla wody i rozpuszczonych w niej mikroelementów, zabezpieczającą przed redystrybucją dużych ilości Zn zgromadzonych w obszarach nekroz.

Podsumowując, pojawianie się nekroz uważane jest za objaw niekorzystnego działania nadmiaru Zn na komórki blaszki liściowej i jest wykorzystywane jako metoda oceny poziomu tolerancji roślin na Zn (Broadley i inni, 2007; Barabasz i inni, 2010). Wyniki badań otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej sugerują jednak zupełnie inny sens procesów prowadzących do generowania nekroz, wskazując, iż może to być element mechanizmu tolerancji Zn, który prowadzi do „poświęcenia” fragmentu blaszki liściowej dla zgromadzenia nadmiaru metalu na małych obszarach liścia, co prowadzi do ochrony jego pozostałej aktywnej fotosyntetycznie części.

5.4. Ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu zmienia poziom ekspresji genów endogennych odpowiedzialnych za homeostazę metali (Zn, Fe, Ca)

Niższe stężenie Cd w częściach nadziemnych tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (w porównaniu z typem dzikim) wynika z zahamowania pobierania tego pierwiastka. Nie są znane białka transportujące specyficznie kadm. Pierwiastek ten przenoszony jest poprzez transportery odpowiedzialne za pobieranie mikroelementów takich jak Zn, Fe, Mn oraz makroelementu Ca (Clemens, 2006; Clemens i inni, 2012; Menguer i inni, 2013). Mechanizm, który odpowiada za ograniczenie pobierania Cd w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* może być wykorzystany w biotechnologii dla celów ograniczenia stężenia tego pierwiastka w roślinie.

W wyniku ekspresji *AtHMA4-F* następuje zaburzenie równowagi w stężeniu Zn i Cd pomiędzy symplastem a apoplastem (rozdział 4.4.3 i 4.5.1). Przeładowanie apoplastu Zn i Cd może uruchomić mechanizm regulacji pobierania tych pierwiastków, prowadząc do obniżenia ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za ten proces. Przeprowadzona w ramach niniejszych badań analiza ekspresji genów tytoniu metodą mikromacierzy wykazała, że wśród 123 genów o zmienionej ekspresji u roślin transformowanych (w porównaniu do typu dzikiego), nie było jednak genów o obniżonej ekspresji, które kodują białka odpowiedzialne za pobieranie Zn bądź Cd (Załącznik 1). Spośród genów o zmienionej ekspresji szczególną uwagę zwrócono na te, które mogłyby mieć znaczenie dla procesów utrzymania homeostazy metali w tytoniu: *NtZIP1*, *NtVCaB42*, *CAX3*. Do analizy ekspresji metodą Real-Time PCR włączono także kilka innych genów o kluczowym znaczeniu dla regulacji homeostazy metali, których sekwencje nie są obecne na mikromacierzy Affy-135. Są to: (1) *NtIRT1* (udział w pobieraniu Fe oraz Zn, Cd i Mn); (2) *NtMTP1* i *NtHMA3* (transport Zn i Cd do wakuoli); (3) *NtNAS1* (utrzymanie homeostazy metali, w tym Zn i Cd) (Connolly i inni, 2002; Bovet i inni, 2006; Palmer i Guerinot, 2009; Deinlein i inni 2012).

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych na pożywce kontrolnej oraz w obecności Cd wzrósł poziom transkryptu *NtZIP1*. Białka ZIP są odpowiedzialne m.in. za pobieranie Zn, Fe oraz Cd (Colangelo i Guerinot, 2006). Bardzo niewiele niestety wiadomo na temat funkcji *ZIP1* w tytoniu. Sano i inni (2012) pokazali, że ekspresja *NtZIP1* w komórkach tytoniu BY-2 obniża się w obecności Fe. Ekspresja heterologiczna *NtZIP1* w drożdżach wskazała na jego aktywność transportową względem Fe. Na udział białka o zbliżonej sekwencji aminokwasowej do *NtZIP1* - *MtZIP3* z *Medicago truncatula* (61% homologii) w pobieraniu Fe wskazują badania Lopez-Millan i inni (2004). Ekspresja *MtZIP3* umożliwia wzrost mutantów drożdżowych hiperwrażliwych na deficyt Fe na pożywce ze zmniejszonym stężeniem tego pierwiastka. Wiadomo też, że poziom ekspresji *MtZIP3* spada w liściach roślin hodowanych w warunkach deficytu Fe (Lopez-Millan

i inni, 2004). Brak jednak badań mających na celu określenie czy NtZIP1 transportuje Zn. Wiadomo tylko, że ekspresja *AtZIP1* (z *A. thaliana*) w jęczmieniu spowodowała wzrost pobierania Zn i Fe (Ramesh i inni, 2004). Mechanizm tego procesu nie jest do końca jasny, gdyż Milner i inni (2013) wykazali, że *AtZIP1* w *A. thaliana* zlokalizowany jest w tonopląście gdzie odpowiada za remobilizację Zn i Mn z wakuoli. Dodatkowo stwierdzono, że ekspresja *AtZIP1* zachodzi w wiązkach przewodzących, co sugerowałoby jego rolę w regulacji poziomu transportu Zn do pędu (Milner i inni, 2013). Nie jest zatem wykluczone, że białko NtZIP1, które jest homologiczne do *AtZIP1*, mogłoby transportować także Zn. W związku z tym wzrost ekspresji *NtZIP1* u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* mógłby być indukowany sygnałem deficytu Zn powstającym na skutek zmniejszenia jego stężenia w sympląście w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 33 a i d). Lokalizacja komórkowa NtZIP1 nie jest znana, ale jeżeli białko to zlokalizowane byłoby w błonie komórkowej, mogłoby odpowiadać za pobieranie Fe i Zn, a wzrost ekspresji *NtZIP1* raczej tłumaczyłby wzrost pobierania Zn u roślin transgenicznych. Prawdziwość tych rozważań potwierdzą lub zaprzeczą przyszłe badania

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* wykazano zwiększony poziom ekspresji innego genu, kodującego białka z rodziny ZIP - *NtIRT1*. Wiadomo, że ekspresja *NtIRT1* jest indukowana deficytem Fe, rośnie jednak także w obecności Cd, który może wywoływać deficyt Fe (Enomoto i inni, 2007; Hodoshima i inni, 2008). Prace przeprowadzone w wielu laboratoriach wskazują, że wzrost ekspresji *IRT1* w różnych organizmach następuje w odpowiedzi na deficyt Fe, wiadomo także, że białko IRT1 może przenosić Zn i Cd, głównie w warunkach deficytu żelaza (Korshunova i inni, 1999; Connolly i inni, 2002; Palmer i Guerinot, 2009). Moje badania wykazały, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poziom transkryptu *NtIRT1* jest wyższy w porównaniu do typu dzikiego bez względu na obecność Cd (Fig. 49), co sugeruje, że sygnał deficytu Fe jest nie tylko wynikiem ekspozycji roślin na Cd, ale także następstwem ekspresji *AtHMA4-F* w tytoniu. Podwyższona ekspresja *NtZIP1* i *NtIRT1* nie tłumaczy obniżenia pobierania Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*, wskazuje jednak na istniejące u roślin transgenicznych zaburzenie w homeostazie Zn, a także wtórnie Fe (Fe nie jest substratem dla HMA4). Należy podkreślić, że w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności Cd, stężenie Fe w korzeniu jest niższe w porównaniu do roślin typu dzikiego. Jednak gdy rośliny hodowano na pożywce bez Cd, stężenie Fe w korzeniach nie różniło się pomiędzy roślinami transformowanymi a typu dzikiego. U tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanego w obecności Cd aktywność wprowadzonego białka skutkuje przeładowaniem apoplastu tym metalem, co z kolei może uruchamiać ścieżkę sygnałową inicjującą proces, który skutkuje obniżeniem pobierania mikroelementów (w tym Fe) przez białka, które mogą także transportować Cd, co ogranicza jego stężenie w roślinie. Zaburzenie homeostazy metali w badanych roślinach transgenicznych potwierdza także wzrost ekspresji *NtNAS1*, genu, który

koduje syntazę nikotianaminy. Nikotianamina uważana jest za sensor fizjologicznego poziomu Fe oraz istotny element procesu translokacji i dystrybucji Fe oraz Zn i Cd (Takahashi i inni, 2003; Curie i inni, 2009). Deinlein i inni (2012) wskazali, że nikotianamina może brać udział w transporcie Zn w korzeniu do walca osiowego poprzez wiązanie tego pierwiastka, przez co ułatwia jego przemieszczanie się przez symplast. Okazało się, że po wyciszeniu genu *AhNAS2* (metodą RNAi) następuje obniżenie ilości nikotianaminy w *A. halleri*, co koreluje ze znaczącym ograniczeniem translokacji Zn z korzenia do pędu. Oprócz *AhHMA4* (Hanikenne i inni, 2008), *AhNAS2* jest drugim ważnym białkiem koniecznym dla utrzymania zdolności do hiperakumulacji Zn przez rośliny *A. halleri* (Clemens i inni, 2012). Być może w tytoniu *NAS1* jest odpowiedzialny za dystrybucję i tolerancję na Cd, jednak określenie zależności ekspresji *NtNAS1* od stężenia i lokalizacji komórkowej Cd wymaga dalszych badań. Niemniej zmiana ekspresji tego genu świadczy o uruchomieniu mechanizmu regulacji homeostazy Zn/Fe.

Wyniki wskazujące na zmiany w poziomie transkryptu *NtMTP1a* i *NtHMA3* u transformantów (Fig. 49) należy także rozpatrywać w kontekście zaburzenia procesów homeostazy metali w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*. *NtMTP1a* koduje białko odpowiedzialne za akumulację Zn oraz Cd w wakuoli. MTP1 bierze udział w utrzymaniu homeostazy Zn poprzez jego sekwestrację w wakuoli korzeni i pędów (Sinclair i Kramer, 2012). Wiadomo, że ekspresja *NtMTP1a* rośnie w korzeniu tytoniu przy ekspozycji na Cd (Bovet i inni, 2006). Z tego względu uznano, że zwiększenie ekspresji *MTP1a* umożliwia większą akumulację Cd w korzeniu i zapobiega jego nadmiernej translokacji do pędu. U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego następuje wzrost poziomu transkryptu *NtMTP1a* w korzeniach w obecności Cd i spadek poziomu ekspresji *NtMTP1a* u roślin transgenicznych, gdy hodowano je w pożywce bez Cd. Obniżenie ekspresji *NtMTP1a* w korzeniach roślin transgenicznych hodowanych w warunkach bez dodatku Cd, może świadczyć o deficycie Zn w symplaście. Zmniejszenie ilości transkryptu *NtMTP1* może być częścią mechanizmu regulacji prowadzącego do zmniejszenia sekwestracji Zn w wakuoli, a przez to zwiększenia jego ilości w cytoplazmie, gdzie jest niezbędny dla procesów metabolicznych. Podobne wyniki otrzymano dla *NtHMA3* kodującego białko tonoplastowe odpowiedzialne za transport Zn i Cd do wakuoli (Gravot i inni, 2004; Bovet i inni, 2006). Poziom transkryptu *NtHMA3* był większy w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego w obecności Cd, podczas gdy w warunkach kontrolnych jego ekspresja nie różniła się u badanych roślin (Fig. 49). Z literatury wiadomo, że obecność Cd indukuje ekspresję *NtHMA3* w korzeniach tytoniu (Gravot i inni, 2004; Bovet i inni, 2006). Wzrost ekspresji obu wakuolarnych transporterów Zn i Cd *NtMTP1a* i *NtHMA3* w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności Cd jest zgodny z badaniami Gravot i inni (2004), Bovet i inni (2006), wskazującymi na rolę Cd w regulacji ekspresji tych genów. Z drugiej strony wiemy, że

u roślin transformowanych w stosunku do typu dzikiego zmieniony jest stosunek stężeń Cd pomiędzy symplastem a apoplastem (Fig. 41). Wydaje się więc, że nie tylko obecność Cd ale poziom jego stężenia w apoplaście i symplacie jest istotny dla indukcji nieznanej ścieżki sygnałowej odpowiadającej za wzrost ekspresji *NtMTP1a* i *NtHMA3*. Mechanizm taki byłby odpowiedzialny za wzrost akumulacji Cd w wakuoli. Dzięki zwiększeniu akumulacji metali w wakuoli następuje wzrost poziomu tolerancji Cd i ograniczenie translokacji jego nadmiaru do pędu. Wiadomo, że apoplast stanowi pierwszy kompartment, w którym może nastąpić detekcja obecności i stężenia pierwiastków toksycznych oraz uruchomienie ścieżki sygnałowej dla mechanizmów komórkowych odpowiadających za ich detoksykację.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności Cd wykazano zwiększony poziom transkryptu *CAX3* (EB428626) zaś zmniejszony *NtVCaB42* (EB426333) (Fig 47). Sekwencja *CAX3* z tytoniu nie została jeszcze sklonowana i zbadana. *CAX3* wykazuje natomiast wysoki stopień homologii (68%) do *AtCAX3* z *A. thaliana*. *AtCAX3* to wtórny transporter wapnia zlokalizowany w tonoplaście i odpowiadający za transport jonów Ca^{2+} do wakuoli. Wiadomo, że niektóre białka z rodziny CAX mogą także transportować Zn, Cd i Mn (Korenkov i inni, 2007). Wprowadzenie do tytoniu *AtCAX2* lub *AtCAX4* prowadzi to do wzrostu akumulacji kadmu w wakuoli. Wykazano też, że *AtCAX2* i *AtCAX4* mają większe powinowactwo do Cd i Zn niż do Ca (Korenkov i inni, 2007 i 2009). Możliwe, że w tytoniu rolą niektórych białek z rodziny CAX jest udział w detoksykacji Cd w komórce. Wzrost ekspresji *CAX3* u roślin transformowanych *AtHMA4-F* mógłby być efektem uruchomienia procesu sekwestracji Cd w wakuoli w celu ochrony komórki.

U roślin z ekspresją *AtHMA4* rosnących w obecności Cd nastąpiło obniżenie ekspresji *NtVCaB42* genu kodującego białko należące do aneksyn. Aneksyny to wielofunkcyjne białka zależne od obecności jonów Ca^{2+} i wiążące lipidy. Wiadomo, że odpowiadają one za regulację procesów oksydo-redukcyjnych, przekazywanie sygnałów poprzez lipidy w celu koordynacji rozwoju rośliny, ale także biorą udział w odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny (Laohavisit i Davies, 2011). Niewiele wiadomo na temat roli, jaką odgrywa białko VCaB42 w tytoniu. Seals i Randall (1997) wykazali, że jest zlokalizowane w tonoplaście lub związane z mikrosomami i prawdopodobnie odpowiada za biogenezę wakuoli oraz wzrost komórki. Najbliższym homologiem *NtVCaB42* w *A. thaliana* jest *AnnAt4* (49% homologii) - aneksyna, która oddziałuje z aneksyną *AnnAt1* biorąc udział w regulacji odpowiedzi na stres solny i suszy (Huh i inni, 2010). Badania homologów *AnnAt1* i *AnnAt2* w *N. caerulea* wykazały, że ekspresja aneksyn może być regulowana obecnością Zn (Tuomainen i inni, 2010). Lee i inni (2004) wykazali, że *AnnAt4* w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} pełni ważną rolę w przekazywaniu sygnałów u roślin poddanych stresowi solnemu, prawdopodobnie w ścieżce sygnałowej opartej o kwas abscysynowy (ABA).

Możliwe także, że *AnnAt4* odgrywa istotną rolę w przekazywaniu sygnałów związanych z obecnością Cd w komórce. Aneksyny odpowiadają także za regulację sygnałów lipidowych oraz mogą wiązać się z błonami komórkowymi (Lee i inni, 2004). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach ekspresja aneksyny *NtVCaB42* w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności Cd uległa zmniejszeniu w stosunku do roślin typu dzikiego. Taki wynik sugeruje rolę Cd w regulacji ekspresji tej aneksyny i może wskazywać na znaczenie *NtVCaB42* w utrzymaniu homeostazy metali. Nieznany jest mechanizm, w którym aneksyny mogłyby bezpośrednio regulować stężenie metali w kompartmentach w komórce (co mogłoby być częścią procesu utrzymania homeostazy), jednak prawdopodobne jest, że mogłyby one poprzez regulację aktywności receptorów lub transporterów błonowych (tonoplastowych lub w błonie komórkowej) kontrolować transport transbłonowy mikroelementów. Możliwe, że wśród regulowanych transporterów byłyby takie, które odpowiadają za pobieranie Fe, Zn i Cd. Weryfikacja powyższej hipotezy wymaga dalszych szczegółowych badań.

U wszystkich organizmów eukariotycznych wolne jony wapnia pełnią funkcję wtórnych przekaźników sygnałów kontrolujących mechanizmy fizjologiczne w odpowiedzi na bodźce endogenne i egzogenne (Jaworski i inni, 2011). Stężenie jonów Ca^{2+} w komórce jest ściśle kontrolowane i utrzymywane na niskim poziomie, jednak gdy pojawiają się czynniki stymulujące, na przykład stres abiotyczny, dochodzi do chwilowego dużego wzrostu stężenia wapnia w cytozolu. Tego rodzaju pulsy wapniowe tworzą specyficzną sygnaturę wapniową. W komórce roślinnej występują liczne białka posiadające domeny wiążące jony wapnia, przez co stają się białkami sensorowymi w stosunku do sygnałów wapniowych (Jaworski i inni, 2011). Jak już wielokrotnie podkreślano, apoplast jest jednym z pierwszych miejsc, gdzie zachodzi detekcja obecności pierwiastków toksycznych, a informacja o tym jest przekazana do wnętrza komórki. Detekcja podwyższonego stężenia Cd w apoplaście przy udziale sygnałów wapniowych stanowiłaby sprawny mechanizm prewencyjny dla komórki, dzięki któremu mogłyby zostać uruchomione procesy prowadzące do ograniczenia pobierania Cd. Obecnie niewiele wiadomo na temat białek, które mogłyby uczestniczyć w tym procesie, wyniki moich badań dają jednak pewien punkt wyjścia wskazując, że w tytoniu, w którym wprowadzenie transgeny prowadzi do wzrostu apoplastycznego stężenia Cd (a nie stężenia całkowitego) następują zmiany ekspresji *CAX3* oraz *NtVCaB42*. Oba geny kodują białka, dla których wapń jest substratem lub aktywatorem oraz mogą brać udział w utrzymaniu homeostazy metali w komórce. Do potwierdzenia powyższych hipotez potrzebne są jednak dalsze badania.

Otrzymane wyniki badań ekspresji genów endogennych (*NtZIP1*, *NtVCaB42*, *NtCAX3*, *NtIRT1*, *NtMTP1a* i *NtHMA3*) wskazują, że w roślinach z ekspresją *AtHMA4-F* następuje zaburzenie homeostazy Zn i związana z tym zmiana ekspresji genów odpowiadających za

pobieranie Fe, Zn oraz Cd, a także za sekwestrację tych pierwiastków oraz Ca w wakuoli. Należy podkreślić jednak, że żaden z powyższych wyników nie tłumaczy ograniczenia pobierania Cd u roślin transformowanych.

5.5. Ograniczenie pobierania Zn i Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* jest następstwem modyfikacji ściany komórek kory korzenia

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* hodowanych w obecności Cd nastąpiło ograniczenie pobierania tego pierwiastka (Fig. 12). Wyniki badań z wykorzystaniem mikromacierzy wskazały, że u tych roślin w obecności Cd następuje wzrost ekspresji genów o-metylotransferazy *NtOMT 1* (Fig. 59 zaznaczono na niebiesko) i transferazy hydroksycynamoylu *NtHCT* (Fig. 59 zaznaczono na czerwono), kodujących białka kluczowe w szlaku biosyntezy lignin (Fig. 59). Badania autofluorescencji lignin oraz poziomu fluorescencji o-safraniny (specyficznego barwnika mocno wiążącego ligniny) wskazały na wzrost lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą, a pierwszą warstwą kory (Fig. 50 a, b, d, e) u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na Cd, czego nie stwierdzono u typu dzikiego (Fig. 50 c, f). W tytoniu hodowanym na pożywcę kontrolnej, nie zaobserwowano wzrostu ekspresji *NtOMT 1* i *NtHCT* oraz różnic w poziomie lignifikacji ścian komórkowych kory korzeni (Fig. 51). U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* nastąpił także wzrost ekspresji *Ntprx11a* (Fig. 59 zaznaczono na brązowo) genu kodującego peroksydazę ściany komórkowej, która może brać udział w polimeryzacji lignin na drodze wolnorodnikowej (Whetten i Sederoff, 1995; Boerjan i inni, 2003). Wolnorodnikowa polimeryzacja lignin odbywa się przy udziale peroksydaz, dla których w odpowiednich warunkach nadtlenu wodoru jest produktem (a nie substratem) (Whetten i Sederoff, 1995; Boerjan i inni, 2003). Wzrostowi lignifikacji ściany komórkowej towarzyszyć będzie więc wzrost poziomu H_2O_2 . W niniejszej pracy, wykorzystując metodę DAB wykazano, że wzrost ilości nadtlenu wodoru w korzeniach roślin z ekspresją *AtHMA4-F* w porównaniu do roślin typu dzikiego hodowanych w obecności Cd występuje, tak samo jak wzrost lignifikacji, w ścianie komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną na całym obwodzie korzenia (Fig. 52 a, b i c). Gdy rośliny hodowano bez Cd nie zauważono znaczących różnic w ilość nadtlenu wodoru, pomiędzy transformantami a roślinami typu dzikiego (Fig. 52 d, e i f).

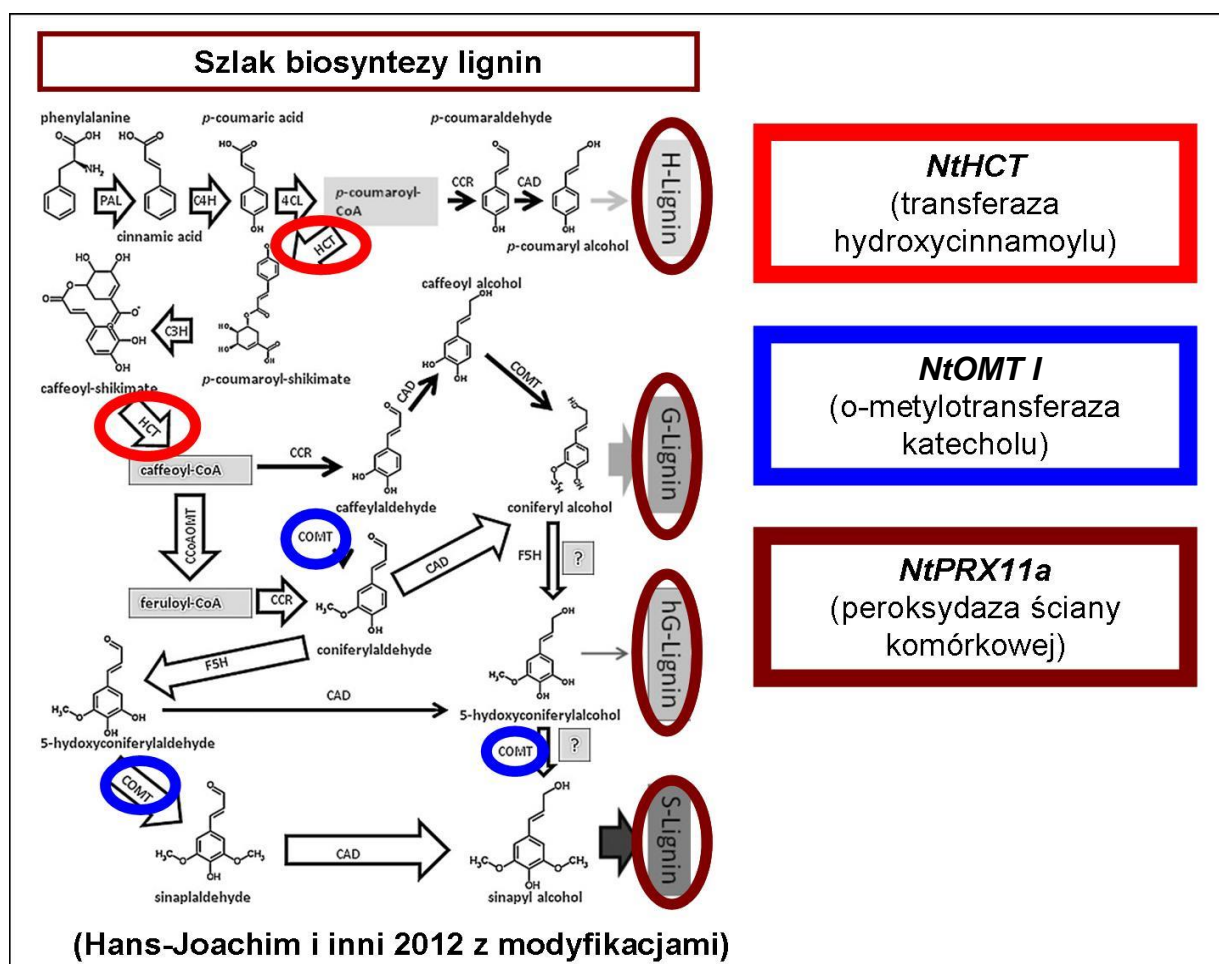


Fig. 59. Szlak biosyntezy lignin. Kolorami wyróżniono białka kodowane przez geny, których ekspresja wzrosła u roślin transformowanych *AtHMA4-F* poddanych ekspozycji na Cd 0,25 μ M przez 4 dni (*NtHCT* - czerwony, *NtOMT I* - niebieski, *NtPrx11a* - brązowy).

Ligniny to wysoko spolimeryzowane związki hydrofobowe powstające w szlaku biosyntezy związków fenylopropanoidowych. Ich obecność zwiększa wytrzymałość ściany komórkowej kosztem zmniejszenia jej elastyczności. O ile szlak biosyntezy lignin poznano dość dobrze, to regulacja procesu lignifikacji jest jeszcze słabo opisana. Z danych literaturowych wiadomo, że wyciszenie *NtHCT* w *N. benthamiana* przy pomocy RNAi (Hoffmann i inni, 2004, 2003), prowadzi do silnego ograniczenia wzrostu roślin poprzez obniżenie biosyntezy lignin, wpływając negatywnie przede wszystkim na rozwój ksylemu. Wyciszenie ekspresji *NtOMT I* poprzez wprowadzenie antysensownego RNA prowadzi do istotnej zmiany w składzie chemicznym lignin, zwiększając w nich udział grup funkcyjnych gwajakolu (Jaack i inni, 1992). Obserwowano także wzrost ekspresji *NtOMT I* w tytoniu infekowanym wirusem mozaiki tytoniu (TMV), co świadczy o roli, jaką regulacja ekspresji tej o-metylottransferazy pełni w stresie biotycznym (Jaacek i inni, 1992). Można z tego wywnioskować, że zarówno gen *NtOMT I*, jak i *NtHCT* (których poziom transkryptu wzrósł u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*) mogą odpowiadać za regulację procesu lignifikacji ścian komórkowych.

Wzrost lignifikacji towarzyszy zazwyczaj odpowiedzi na ingerencję organizmów pasożytniczych, ale też i obecności Cd (Lux i inni, 2011). Ekspozycja na Cd roślin *A. thaliana* i *Noccaea caerulea* prowadzi do wzrostu ekspresji genów ze szlaku biosyntezy lignin (Herbette i inni, 2006; van de Mortel i inni, 2008). Wzrost lignifikacji ścian egzodermy lub/i endodermy zaproponowano jako mechanizm ograniczający dostępność Cd dla rośliny poprzez zmniejszenie poziomu jego pobierania i/lub translokacji do pędu (Lux i inni, 2011). Znane są też przykłady wzrostu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za modyfikację ścian komórkowej w liściach roślin poddanych ekspozycji na Cd, w wyniku czego zwiększa się jej pojemność dla akumulacji jonów metali. Z kolei lignifikacja powoduje większą sztywność i mniejszą przepuszczalność dla wody ścian komórkowej (Herbette i inni, 2006). Tytoń z ekspresją *AtHMA4-F*, jak i rośliny typu dzikiego badane w mojej pracy doktorskiej rosły w pożywce z Cd, jednak u transformantów, gdzie doszło do przeładowania apoplastu Cd/Zn, zaszły zmiany w fenotypie roślin. Wzrost ekspresji *NtHCT*, *NtOMT 1* i *Ntprx11a*, genów kodujących białka zaangażowane w proces lignifikacji, jest więc wynikiem przeładowania apoplastu Zn i Cd u roślin transformowanych. Wiadomo, że apoplast jest pierwszym miejscem, w którym mógłby powstawać sygnał związany z zagrożeniem, jakim jest obecność toksycznych jonów kadmu. U roślin poddanych ekspozycji na Cd oprócz zmian w ekspresji genów powiązanych ze stresem abiotycznym i biotycznym, stwierdzono różnice w poziomie ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w ścieżki sygnałowe, wiązanie i metabolizm reaktywnych form tlenu (ROS – **R**eactive **O**xygen **S**pecies) (Herbette i inni, 2006; van de Mortel i inni 2008; Zhao i inni, 2009; Lux i inni, 2011). Wiadomo, że ekspozycja na Cd prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego, którego efektem jest zahamowanie wzrostu i wydłużania korzeni, co zostało pokazane na różnych gatunkach roślin (Xiong i inni, 2009). Być może wzrost poziomu Cd w apoplaście u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* jest pierwszym bodźcem, który prowadzi do indukcji mechanizmów zaangażowanych w regulację metabolizmu w obliczu stresu oksydacyjnego w komórce.

Z literatury wiadomo, że ekspozycja na Cd w różnych gatunkach roślin, prowadzi do uformowania się pasemek Caspariego oraz egzodermy bliżej wierzchołka wzrostu w porównaniu do roślin rosnących w warunkach kontrolnych także u *A. thaliana* (Schreiber i inni, 1999; Lux i inni, 2011). Ekspresja ektopowa *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do przeładowania apoplastu Zn i Cd w całej roślinie. Lignifikację zaobserwowano jednak jedynie w specyficznym miejscu, pomiędzy epidermą a korą pierwotną. Co ciekawe jest to obszar komórek kory pierwotnej, który w dalszym rozwoju u roślin tytoniu wchodzi w skład egzodermy (Shufflebottom i inni, 1993; Enstone i inni, 2003). Interesujące jest także to, że w ramach pracy doktorskiej zidentyfikowano występujący wzrost ekspresji *NtOMT 1* (kodującego metylotransferazę) u transformantów hodowanych

w obecności Cd. Jaeck i inni (1996) wykazali lokalizację ekspresji *NtOMT I* specyficznie w epidermie i częściowo pierwszej warstwie kory tytoniu. Możliwe, że białko NtOMT I bierze udział w powstawaniu egzodermy w tytoniu.

Otrzymane wyniki (indukcja lignifikacji ściany komórkowej tylko pomiędzy epidermą, a pierwszą warstwą kory) sugerują także, że ścieżka sygnałowa prowadząca do uruchomienia procesu lignifikacji nie jest dostępna w większości komórek kory, oprócz tych, które w trakcie rozwoju różnicują się w egzodermę. Podsumowując, można wskazać, że ekspresja *AtHMA4-F* prowadząca do wzrostu eksportu Zn i Cd do apoplastu może prowadzić do powstania sygnału obecności nadmiaru Cd, co z kolei prowadzi do wcześniejszego wykształcenia się egzodermy u roślin transformowanych niż typu dzikiego. Dzięki temu pobieranie Cd jest ograniczone, a w konsekwencji także innych pierwiastków, w tym Zn.

Wzrost poziomu lignifikacji ściany komórkowej prowadzi do ograniczenia jej przepuszczalności dla jonów transportowanych wraz z wodą w obrębie apoplastu, a co za tym idzie zmniejszenia ich transportu radialnego w korzeniu. W konsekwencji zachodzi ograniczenie pobierania nie tylko Cd, ale też Zn i innych pierwiastków. Badania profilu jonowego wskazały także, że nastąpiło zahamowanie pobierania: B, Co, Cu, Ni, Mo, Fe. Dodatkowo obniżonemu pobieraniu towarzyszył wzrost translokacji do pędu Cu, Fe, Ni, Mo, Zn, co może być wtórnym efektem rekompensującym obniżony poziom stężeń tych pierwiastków w korzeniu. Wzrost translokacji niklu do pędu może być wynikiem niespecyficzności któregoś z transporterów mikroelementów do pędu. Może także wynikać ze wzrostu stężenia nikotianaminy u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F*, u którego następuje wzrost ekspresji genu *NtNAS1*, kodującego syntazę nikotianaminy. Nikotianamina to aminokwas niebiałkowy wiążący metale głównie Fe i Zn, ale także może wiązać się z Ni (Benes i inni, 1983). Wiązanie pierwiastków z nikotianaminą służy do ich transportu pomiędzy organami w roślinie (Stephan i Scholz, 1993). Kim i inni (2005) pokazali, że wprowadzenie nadekspresji *HvNAS1* do tytoniu prowadzi do wzrostu tolerancji na Ni oraz akumulacji Ni w pędach w porównaniu do roślin kontrolnych (Kim i inni, 2005).

Należy podkreślić, że opisany mechanizm prowadzący do zahamowania pobierania Cd i mikroelementów u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* nie powoduje w pędzie ograniczenia stężenia ważnych mikroelementów w stosunku do typu dzikiego, natomiast skutkuje 2-krotnym obniżeniem stężenia Cd. Taki wynik potwierdza możliwość wykorzystania modyfikacji poziomu lignifikacji ścian komórkowych korzeni roślin z użyciem ekspresji *AtHMA4-F* do ograniczenia ilości Cd w częściach nadziemnych.

5.6. Koniec C jest istotny dla aktywności białka AtHMA4 w układzie heterologicznym

Białko AtHMA4 posiada 8 segmentów transbłonowych, a końce C i N umiejscowione są w cytoplazmie. Cechą charakterystyczną i wyróżniającą AtHMA4 spośród innych P_{1B}-ATPaz jest wyraźnie dłuższy koniec C zawierający 13 par cystein oraz 11 terminalnych histydyn (aminokwasy te mają silne powinowactwo do Zn i Cd). Koniec C bierze udział w regulacji aktywności transportowej pełniąc rolę sensoryczną i selektywną względem substratu (Willians i Mills, 2005; Bækgaard i inni 2010). Ekspresja białka AtHMA4 bez końca C (AtHMA4-T) w układzie heterologicznym w drożdżach zwiększa poziom eksportu obu pierwiastków poza komórkę, zwiększając tym samym poziom tolerancji na Zn i Cd. Taki wynik sugeruje, że obecność końca C hamuje transport Zn i Cd prowadzony przez AtHMA4, co jest przykładem negatywnej regulacji jego aktywności (Mills i inni 2005, Bækgaard i inni, 2010). Zupełnie inne wyniki dostarczyły badania z użyciem roślin *Arabidopsis* z mutacją w genach *AtHMA2* i *AtHMA4* (mutant *hma2hma4*) prowadzącą do zmiany w profilu jonowym i w efekcie do karłowatości (Hussain i inni, 2004). Okazało się, że ekspresja *AtHMA4* pod konstytutywnym promotorem w dużej części przywróciła fenotyp mutantów *Arabidopsis hma2/hma4*, doprowadzając do przywrócenia stężenia Zn i Cd w pędach do poziomu obserwowanego w roślinach typu dzikiego (Mills i inni, 2010). Natomiast w przypadku ekspresji *AtHMA4-trunc* (bez końca C – w niniejszej pracy doktorskiej użyto tej samej sekwencji) w *hma2hma4* nie nastąpiło przywrócenie profilu jonowego do poziomu roślin typu dzikiego (Mills i inni, 2010). Możliwe, że aktywność białka AtHMA4-F jest regulowana obecnością końca C oraz innych czynników regulacyjnych występujących jedynie w roślinach, a nie pojawiających się w komórkach drożdży.

Przeprowadzone przeze mnie badania potwierdzają istotne znaczenie obecności końca C dla aktywności AtHMA4 w roślinie. Ekspresja *AtHMA4-F* w tytoniu prowadzi do niewielkiego wzrostu translokacji oraz zahamowania pobierania Zn przy ekspozycji roślin na 100 μ M Zn oraz dużego wzrostu translokacji Zn i Cd po ekspozycji roślin na niskie i wysokie stężenia Cd, czemu towarzyszy ograniczenie pobierania obydwu pierwiastków. W przypadku roślin z ekspresją *AtHMA4-T* nie obserwowano wzrostu translokacji Zn w żadnym z doświadczeń przeprowadzonych na roślinach hodowanych w obecności różnych stężeń tego pierwiastka. Niewielki wzrost translokacji Zn zaobserwowano u dwóch linii roślin z ekspresją *AtHMA4-T* hodowanych w obecności 5 μ M Cd (Fig. 21), przy czym w tym układzie translokacja Cd oraz pobieranie Zn i Cd także uległo niewielkim zmianom, nieporównywalnym ze zmianami w wyniku ekspresji pełnej kopii AtHMA4 (Fig. 18 i 19). W przypadku ekspozycji transformantów AtHMA4-T na 5 μ M Cd translokacja tego pierwiastka do pędu zmieniła się w bardzo małym stopniu, brak było także hamowania pobierania Cd (co miało miejsce u roślin z ekspresją *AtHMA4-F*). Wszystko to

wskazuje, że ekspresja *AtHMA4-T* w tytoniu ma zdecydowanie mniejszy wpływ na pobieranie, translokację oraz tolerancję na Zn i Cd roślin tytoniu niż ekspresja pełnej kopii białka *AtHMA4-F*. Poziom tolerancji na Zn roślin z ekspresją *AtHMA4-T* był nieco wyższy w porównaniu do tytoniu z ekspresją *AtHMA4-F* (Fig. 28). Jak wykazano, powstawanie nekroz u roślin z ekspresją *AtHMA4-F* zależy od poziomu przeładowania apoplastu cynkiem wynikającego z aktywności białka *AtHMA4-F* odpowiadającego za eksport Zn z komórki (rozdział 4.4.2 i 4.4.3.3). Zatem mniejsza ilość nekroz powstałych na liściach roślin z ekspresją *AtHMA4-T* może świadczyć o mniejszej skali przeładowania apoplastu Zn w porównaniu z transformantami *AtHMA4-F*.

Należy dodać, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* zaobserwowano wyższy poziom tolerancji na Cd niż u roślin typu dzikiego, przy czym stężenie Cd w badanych liniach roślin było takie samo. Wyższy poziom tolerancji na Cd zaobserwowano także u roślin z ekspresją pełnej kopii *AtHMA4-F*, jednak w tym wypadku stężenie Cd w pędach roślin transformowanych było obniżone w stosunku do roślin typu dzikiego. Trudno jednoznacznie wskazać, jaka jest przyczyna wzrostu poziomu tolerancji na Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-T*, jest jednak możliwe, że obecność końca C decyduje o specyficzności *AtHMA4* odnośnie transportowanego pierwiastka wpływając na większe powinowactwo do Zn. Taką hipotezę wysunęła Mills i inni (2010). Wiadomo, że obecność 11 kolejnych histydyn na końcu C to motyw, który jest charakterystyczny dla białek specyficznie wiążących Zn. Białko *AtHMA4* bez końca C miałoby zmniejszoną efektywność wobec transportu Zn, ale dalej mogłoby transportować Cd do apoplastu, co zmniejszyłoby jego toksyczność dla komórki.

Podsumowując, wykazano, że ekspresja *AtHMA4-T* u roślin tytoniu nie prowadzi do zwiększenia translokacji lub ograniczenia pobierania Zn i Cd obserwowanego u roślin z ekspresją pełnej kopii *AtHMA4*, co świadczy o istotnym znaczeniu końca C dla aktywności białka *AtHMA4-F*.

5.7. Ekspresja *AtHMA4-C* w roślinach tytoniu prowadzi do wzrostu pobierania Zn i Cd

Mills i inni (2010) wskazali, że ekspresja końca C białka *AtHMA4* (końcowe 457 aminokwasów) w drożdżach prowadzi do komplementacji hiperwrażliwości mutantów *zrc1cot1* drożdży na obecność Zn w podłożu w znacznie większym stopniu niż ekspresja pełnej kopii białka *AtHMA4*. Analogicznie u drożdży z mutacją *ycf1* (koduje transporter odpowiedzialny za transport Cd do wakuoli, warunkując tolerancję na Cd), ekspresja *AtHMA4-C* umożliwia wzrost zmutowanego szczepu drożdży *ycf1* na podłożu z wysokimi stężeniami Cd. Ekspresja pełnej kopii *AtHMA4-F* u drożdży *ycf1* zwiększa także odporność na Cd, jednak w mniejszym zakresie niż ekspresja *AtHMA4-C*. Powyższe wyniki tłumaczy się obecnością na końcu C 13 par cystein oraz łańcucha 11 histydyn - aminokwasów wiążących Zn i Cd, co skutkuje zmniejszeniem poziomu

wrażliwości drożdży na oba metale (Mills i inni, 2010). W związku z tym pojawiło się pytanie, czy nadekspresja *AtHMA4-C* w roślinach może przyczynić się do wzrostu poziomu tolerancji na Zn i Cd, co mogłoby być ważne dla modyfikacji roślin dla potrzeb fitoremediacji. Badania przeprowadzono na mutantach roślin *Arabidopsis thaliana* - *hma2hma4*. Mutacja *hma2hma4* powoduje zahamowanie translokacji Zn z korzeni do pędów, co uniemożliwia prawidłowy rozwój roślin. Ekspresja *AtHMA4-C* nie prowadzi do przywrócenia wzrostu oraz poziomu stężenia Zn w pędach *Arabidopsis* do poziomu typowego dla roślin typu dzikiego. Nieoczekiwanie, w niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że wprowadzenie *AtHMA4-C* do roślin tytoniu prowadzi do wzrostu stężenia Zn lub Cd w korzeniach przy ekspozycji na niskie stężenie tych pierwiastków, co wynika ze wzrostu ich pobierania (Fig. 22 a i c oraz 24 a). Interesujące jest to, że wzrost pobierania Zn był zdecydowanie bardziej wyraźny u roślin hodowanych w obecności 0,5 μM niż 10 μM Zn (Fig. 22). Natomiast wzrost translokacji Zn do pędów występował tylko u tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C* hodowanym przy 0,5 μM Zn (Fig. 23). Z przeprowadzonych przeze mnie badań lokalizacji białka fuzyjnego *AtHMA4-C::GFP* wynika, że znajduje się ono w obrębie cytoplazmy (Fig. 9). Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że wprowadzenie białka bogatego w liczne domeny wiążące Zn (ograniczając w ten sposób jego dostępność dla metabolizmu komórkowego) może wywołać u roślin sygnał niedoboru tego pierwiastka i uruchomienie mechanizmów związanych z jego pobieraniem.

Podsumowując, można postawić hipotezę, że obecność *AtHMA4-C* w tytoniu (organizmie modelowym), prowadzi do wiązania Zn w cytoplazmie, co wywołuje sygnał jego deficytu. Zachodzi indukcja wzrostu pobierania Zn, ale tylko gdy stężenie tego pierwiastka w podłożu, a tym samym w roślinie, jest niskie. Należy zaznaczyć, że rośliny z ekspresją *AtHMA4-C* rosnące w obecności 0,25 μM Cd miały 2-3 krotnie zwiększone pobieranie Cd, ale nie Zn. Wzrost pobierania tylko Cd jest zaskakujący i wskazuje, że ekspresja *AtHMA4-C* ingeruje w bardzo złożony mechanizm regulacji homeostazy pierwiastków skutkując uruchomieniem pobierania różnych jonów w zależności od składu pożywki. Jak do tej pory, nie udało się wskazać specyficznych mechanizmów pobierania Cd, a ich istnienie jest wątpliwe (Clemens i inni, 2012). Można spekulować, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* następuje stymulacja pobierania pierwiastka lub pierwiastków poprzez białka, dla których Zn i Cd mogą być niespecyficznymi substratami, przy czym można przypuszczać, że powinowactwo do Cd jest silniejsze. Powyższe wyniki wskazują na możliwość wykorzystania transformacji *AtHMA4-C* dla celów fitoremediacji, gdyż w glebach, gdzie występuje nawet niskie stężenie Cd najprawdopodobniej będzie dochodzić do akumulacji nadmiaru Cd.

Niestety, mechanizmy odpowiedzialne za regulację pobierania Zn i Cd są nie do końca poznane, w związku z czym trudno spekulować co odpowiada za wzrost pobierania jednego bądź

drugiego pierwiastka w tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C*. Tym niemniej określenie przyczyn obserwowanego wzrostu pobierania Zn bądź Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* może mieć znaczenie dla rozwoju biotechnologii dla celów fitoremediacji.

5.8. Ekspresja *AtHMA4-C* w tytoniu prowadzi do obniżenia poziomu tolerancji na Zn lub Cd

Ekspresja *AtHMA4-C* obniża poziom tolerancji na wysokie (100 i 200 μM) stężenia Zn. U roślin transformowanych obniżony poziom tolerancji objawia się wcześniejszym pojawianiem się nekroz. W przeciwieństwie do roślin typu dzikiego, jak i z ekspresją *AtHMA4-F* nekrozy u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* są duże i podłużne oraz powstają blisko unerwienia (Fig. 30). W niniejszej pracy wykazano, iż białko kodowane w transgenicznym tytoniu przez *AtHMA4-C* jest zlokalizowane w cytoplazmie (Fig. 9). Koniec C białka AtHMA4 może wiązać do 10 jonów Zn (Baekgaard i inni, 2010). Badania z wykorzystaniem barwnika Zinpyr-1 wskazują, że u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* hodowanych w obecności 100 μM Zn, metal ten zgromadzony jest w liściach wewnątrz komórek będących w pobliżu nerwów. Można postawić hipotezę, że AtHMA4-C wiąże Zn w cytoplazmie komórek, prowadząc do zmiany jego dystrybucji, a ponieważ Zn dostaje się do liści z korzeni poprzez system naczyń ksylemu, nagromadzenie Zn u roślin transgenicznych występuje w okolicach nerwów. W konsekwencji, przy unerwieniu powstają nekrozy spowodowane toksycznością nadmiaru Zn. W rozdziale 5.3 wskazano, iż powstanie nekroz w tytoniu jest indukowane przekroczeniem pewnego progowego poziomu stężenia Zn w apopląście. W wyniku ekspresji *AtHMA4-F* krytyczny poziom stężenia Zn w apopląście jest przekroczony u roślin hodowanych w obecności 100 μM Zn, przy niższym stężeniu całkowitym Zn w blaszce liściowej w porównaniu do roślin typu dzikiego. U roślin typu dzikiego tak wysokie stężenie Zn w apopląście jak u transformantów AtHMA4-F (hodowla 100 μM Zn) występuje dopiero przy ekspozycji roślin na 200 μM Zn. Nekrozy tych roślin stanowiły miejsce gromadzenia się nadmiaru Zn, przez co mniejsze jego ilości występowały w pozostałej części blaszki liściowej. Niestety u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* nie udało się wykonać analizy lokalizacji Zn w częściach blaszki liściowej zawierającej nekrozy. Niepowodzeniem zakończyły się także badania stężenia Zn w płynie apoplastycznym. Trudno jest więc u roślin z ekspresją *AtHMA4-C* na obecnym etapie badań wskazać, jaki jest mechanizm powstawania nekroz o innym wyglądzie i lokalizacji niż u roślin typu dzikiego i z ekspresją *AtHMA4-F*.

Wiadomo, że poziom tolerancji na metale ciężkie w roślinie zależy od sprawności systemu detoksykacji, zatem od możliwości odizolowania tych pierwiastków od miejsc aktywnych metabolicznie, istotnych dla życia komórek i organizmu. Oczekiwano, że ekspresja *AtHMA4-C*, kodującego białko mogące wiązać Cd, doprowadzi do zwiększenia poziomu tolerancji na ten pierwiastek. Okazało się jednak, że ekspresja *AtHMA4-C* prowadzi do zmniejszenia poziomu

tolerancji na Cd. Jedną z przyczyn takiego efektu może być niewielki wzrost stężenia Cd w pędach roślin transformowanych w porównaniu do roślin typu dzikiego (Fig. 24 b i d). Obecność *AtHMA4-C* w komórkach tytoniu może prowadzić do wiązania Cd, jednak gromadzenie się kompleksów wprowadzonego białka z Cd w cytoplazmie nie musi być korzystne dla metabolizmu komórki. Wojas i inni (2009) badali rośliny tytoniu z ekspresją *AtPCS1* (syntaza fitochelatyn z *A. thaliana*) genu kodującego kluczowy enzym na drodze syntezy fitochelatyn (PC). PC to peptydy tiolowe o dużym powinowactwie do Cd, których główną rolą jest jego wiązanie, a przez to zabezpieczenie metabolizmu komórki przed toksycznym działaniem Cd. Niestety, ekspresja *AtPCS1* nie prowadziła do wzrostu poziomu tolerancji na Cd, a wręcz przeciwnie, powodowała zwiększenie wrażliwości roślin. Przyczyną jest prawdopodobnie brak możliwości transportu kompleksów Cd-PC do wakuoli i fizjologiczne właściwości samego enzymu, który oprócz syntezy może prowadzić do rozkładu fitochelatyn (Wojas i inni, 2009). W rezultacie, obecne w cytoplazmie kompleksy PC-Cd są rozkładane i do cytoplazmy ponownie uwalniany jest Cd. Obecność Cd wywołuje stres oksydacyjny, natomiast biosynteza PC następuje przy wykorzystaniu glutationu, który jest kluczowym elementem ochrony przed stresem oksydacyjnym. Wykorzystanie glutationu do produkcji fitochelatyn prowadzi do zmniejszenia tolerancji na stres oksydacyjny wywoływany przez Cd, co prowadzi u rośliny z ekspresją *AtPCS1* do obniżenia poziomu tolerancji na ten metal (Wojas i inni, 2008). Nie jest wykluczone, że ekspresja *AtHMA4-C* ingeruje w mechanizmy odpowiedzialne za tolerancję na Cd. Problem ten wymaga jednak dalszych badań. Obserwowane obniżenie poziomu tolerancji na Cd u roślin tytoniu z ekspresją *AtHMA4-C* może stanowić przeszkodę w wykorzystaniu modyfikacji z użyciem tego genu dla potrzeb fitoremediacji.

6. Podsumowanie

Prawie połowa ludzkości narażona jest na niedobór Zn (mikroelement) wynikający z niskich stężeń tego pierwiastka w żywności pochodzenia roślinnego. Z drugiej strony, wraz z pożywieniem do organizmu dostają się także toksyczne metale jak np. Cd. Dla poprawy jakości składu mineralnego jadalnych części roślin podejmuje się próby zwiększenia ilości mikroelementów oraz ograniczenia obecności pierwiastków toksycznych (biofortyfikacja). Rośliny mogą być także wykorzystane do oczyszczania gleb z metali toksycznych (fitoremediacja/fitoekstrakcja). Dla realizacji tych celów stosuje się między innymi metody inżynierii genetycznej.

Celem pracy doktorskiej była ocena przydatności konstruktów *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T* dla celów biotechnologii (modyfikacji dystrybucji korzeń/pęd cynku i kadmu dla potrzeb fitoremediacji oraz biofortyfikacji) poprzez analizę modyfikacji wzoru akumulacji tych metali oraz poznanie mechanizmów generowania fenotypu roślin tytoniu z ekspresją transgenów.

Cel pracy został osiągnięty, a dodatkowo udało się wskazać nieznane wcześniej mechanizmy, biorące udział w utrzymaniu homeostazy metali w roślinie.

Materiałem doświadczalnym w ramach mojej pracy doktorskiej była roślina modelowa – tytoń: typu dzikiego oraz z ekspresją wyżej wymienionych trzech wariantów *AtHMA4* pod promotorem CaMV 35S. *AtHMA4* koduje P1B-ATPazę zlokalizowaną w błonie komórkowej, która przenosi jony Zn^{2+} a także Cd^{2+} do apoplastu. Jej funkcja fizjologiczna to kontrola translokacji Zn (i Cd) z korzeni do pędu poprzez załadunek tych metali do ksylemu. Wprowadzenie *AtHMA4* do roślin może zatem prowadzić do modyfikacji poziomu akumulacji i dystrybucji Zn i Cd. Zwiększenie ilości Zn i Cd w częściach nadziemnych jest konieczne dla efektywnego usuwania metali z gleby (fitoremediacja) oraz wzbogacania w mikroelementy (biofortyfikacja) nadziemnych części jadalnych u roślin. Uważa się, że białko HMA4, obecne także w tkankach liści, eksportując Zn i Cd do apoplastu może odgrywać rolę w tolerancji na te metale.

Badania lokalizacji białka fuzyjnego *AtHMA4::GFP* w komórkach transformowanego tytoniu wykazały, że jest ono zlokalizowane w błonie komórkowej, zatem podobnie jak u *A. thaliana* przenosi Zn do apoplastu.

Pierwszym etapem badań było określenie fenotypu roślin transformowanych. W zakresie modyfikacji akumulacji i tolerancji na Zn i Cd zastosowano ocenę bonitacyjną oraz analizę poziomu stężenia Zn i Cd w roślinach transgenicznym i typu dzikiego hodowanych w warunkach hydroponicznych przy różnych stężeniach Zn (0,5 - 200 μM) i Cd (0,25 i 5 μM). Wykazano, iż ekspresja *AtHMA4* w różny sposób zmienia pobieranie i dystrybucję Zn i Cd korzeń/pęd (od hamowania pobierania i translokacji do pędu - do stymulacji) co zależy od stężenia tych metali

w pożywce. Taki rezultat był zaskakujący, ponieważ AtHMA4 nie pełni roli w pobieraniu pierwiastków. U roślin transgeniczných nastąpiło także obniżenie tolerancji na wysokie stężenia Zn przy niezmiennym jego stężeniu w pędach w porównaniu do roślin typu dzikiego.

Wykazano, metodami pośrednimi, że zmiany w pobieraniu Zn i Cd oraz obniżenie poziomu tolerancji na Zn wynikają z aktywności białka AtHMA4 w tytoniu. W wyniku eksportu Zn/Cd z komórki dochodzi do obniżenia ich stężenia w symplasmie oraz wzrostu w apoplasmie. Postawiono hipotezę, że taka zmiana w lokalizacji Zn i/lub Cd w komórce może prowadzić do uruchomienia endogennych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację homeostazy metali, co mogło w znacznym stopniu przyczynić się do powstania opisanych powyżej cech fenotypowych roślin transgeniczných. W celu weryfikacji postawionej hipotezy określono dystrybucję Zn w komórkach i tkankach: (i) poprzez analizę stężenia Zn w symplasmie (w izolowanych protoplastach) i w apoplasmie (metodą infiltracji i wirowania); (ii) poprzez analizę stężenia Zn w symplasmie (w protoplastach) z zastosowaniem indykacyjnego dla Zn barwnika fluorescencyjnego - Zinpyr-1; (iii) poprzez analizę lokalizacji Zn w tkankach na przekrojach poprzecznych korzeni i liści.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-F* stężenie Zn w symplasmie było niższe niż u roślin typu dzikiego, zaś w apoplasmie wyższe. Stwierdzono także duże zmiany w lokalizacji Zn w korzeniach i liściach. W roślinach typu dzikiego Zn akumulowany jest przede wszystkim wewnątrz komórek, natomiast u transformantów w ścianach komórkowych. Ważnym wnioskiem z przeprowadzonych badań było wskazanie na rolę poziomu stężenia Zn w apoplasmie w rozwoju nekroz w blaszce liściowej (symptomów wrażliwości na Zn). Wzrost stężenia Zn w ścianie komórkowej transformantów w wyniku aktywności HMA4 (prowadzącej do przeładowania apoplastu tym metalem) indukował powstawanie nekroz, których obecność wskazywała na obniżenie tolerancji na Zn. Ustalono także, że powstawanie nekroz wiąże się z gromadzeniem wysokich stężeń Zn w grupach komórek w obrębie blaszki liściowej. Wysłano hipotezę, zgodnie z którą przeładowanie apoplastu cynkiem w blaszce liściowej roślin transformowanych prowadzi do powstania sygnału „alarmowego”, informującego o wysokim poziomie tego pierwiastka. W dalszej kolejności, aby ograniczyć negatywne skutki obecności nadmiaru Zn, jest on transportowany tylko do wybranych komórek, chroniąc pozostałe. Jeżeli poziom Zn jest zbyt wysoki, komórki zamierają tworząc nekrozę.

Wykazano także, iż ekspresja *AtHMA4* w tytoniu prowadzi do zahamowania pobierania Cd, co wskazuje na udział endogennych mechanizmów regulacji homeostazy metali w generowaniu fenotypu transformanta. Ze względu na potencjalne możliwości wykorzystania w biofortyfikacji i fitoremediacji mechanizmu prowadzącego do ograniczenia pobierania Cd, przeprowadzono analizę porównawczą profilu ekspresji genów roślin typu dzikiego i transformantów z zastosowaniem mikromacierzy i analizy Real-Time PCR. Celem była identyfikacja

mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za obniżenie akumulacji Cd w wyniku ekspresji *AtHMA4* w tytoniu. Wykazano między innymi wzrost (w porównaniu do roślin typu dzikiego) ekspresji genów kluczowych dla szlaku biosyntezy lignin. Dalsze badania biochemiczne wykazały, że za ograniczenie pobierania Cd odpowiada wzrost lignifikacji ściany komórkowej pomiędzy epidermą a korą pierwotną korzenia. Przeprowadzona analiza profilu jonowego korzeni i pędów wykazała, że wzrost lignifikacji u roślin z ekspresją *AtHMA4* doprowadził do ograniczenia pobierania także Zn, Ni, Mo, Cu, Co, B i Fe. Dodatkowo wykazano, iż ekspresja *AtHMA4* ingeruje w metabolizm roślin transformowanych, zmieniając wzór ekspresji genów odpowiedzialnych za regulację homeostazy metali (*NtIRT1*, *NtNAS1*, *HMA3*, *MTP1a*) oraz za przebieg 14-tu innych procesów metabolicznych. Taki rezultat dowodzi, że wprowadzenie genu do rośliny jest tylko pierwszym etapem generowania zmian w transformowanej roślinie prowadzącym do modyfikacji procesów molekularnych, a w efekcie metabolicznych w roślinie, co skutkuje powstaniem fenotypu nie zawsze wynikającego z funkcji fizjologicznej, jaką pełni kodowane białko. Dla przypomnienia, aktywność *AtHMA4* w *Arabidopsis* warunkuje translokację Zn/Cd do pędu, podczas gdy ekspresja *AtHMA4* w tytoniu prowadzi do opisanych wyżej bardzo zróżnicowanych cech fenotypowych.

Ważną częścią badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej było porównanie modyfikacji stężenia Zn i Cd w korzeniach i pędach tytoniu z ekspresją *AtHMA4-T* (koduje białko bez C-końca) oraz *AtHMA4-C* (koduje cytoplazmatyczny C-koniec). Pobieranie, translokacja i tolerancja na Zn i Cd u roślin z ekspresją *AtHMA4-T* w niewielkim stopniu różniła się w porównaniu do typu dzikiego. Jak opisano powyżej, zmiany pobierania, translokacji i tolerancji na Zn i Cd były obserwowane u roślin z ekspresją pełnej kopii *AtHMA4-F*, dlatego otrzymany wynik wskazuje, że usunięcie z białka *AtHMA4-F* końca C powoduje obniżenie jego aktywności.

U roślin z ekspresją *AtHMA4-C* obserwowano podwyższony poziom akumulacji Zn i Cd oraz zwiększoną translokację tych pierwiastków do pędu. Wykazano, że białko fuzyjne *AtHMA4-C::GFP* w tytoniu zlokalizowane jest w cytoplazmie, a ponieważ zawiera aminokwasy, które wiążą się z Zn i Cd, wzrost akumulacji i translokacji Zn u transformantów *AtHMA4-C* może być następstwem wiązania Zn, zatem konsekwencją zaburzenia jego homeostazy komórkowej. Taki wynik wskazuje na możliwość wykorzystania ekspresji *AtHMA4-C* w roślinach dla potrzeb fitoremediacji.

W kontekście problematyki oceny ryzyka dla środowiska wynikającego z wprowadzenia roślin genetycznie modyfikowanych, moje badania wskazują, że wprowadzenie transgenu może powodować nieoczekiwane i często niechciane efekty wynikające z zachwiania równowagi procesów metabolicznych, co spowodowane jest aktywnością białka kodowanego przez transgen. Problem ten jest często pomijany w publikacjach, niemniej konsekwencje jego istnienia są ogromne. Aby wprowadzić rośliny genetycznie modyfikowane do użytku rolniczego w UE, należy

wykonać ocenę ryzyka dla środowiska, ale także zdrowia człowieka. Istnieje oczekiwanie, że u roślin modyfikowanych genetycznie w wyniku jednej transformacji tylko jedna ścieżka metaboliczna zostanie zmieniona. Jak pokazują moje badania wprowadzenie transgeny oddziałuje na metabolizm rośliny użytej do transformacji prowadząc do zmian w transkrypcji i metabolizmie. Następuje więc modyfikacja wielu ścieżek metabolicznych. Bardzo trudno wyobrazić sobie, aby można było zmienić tylko jedną ścieżkę metaboliczną, ale też nie wydaje się to być koniecznym warunkiem dla użycia organizmów modyfikowanych genetycznie w biotechnologii.

Należy podkreślić, że wykonana praca doktorska wskazała wiele nowych aspektów wynikających z ekspresji transgeny w roślinie, wpisując się w istniejące zapotrzebowanie na badania mające na celu określenie nie tylko efektów transformacji, ale także mechanizmów, które generują fenotyp.

Tym niemniej odnosząc się do celu pracy, uwzględniając otrzymane wyniki opisane powyżej, należy stwierdzić, że przydatność badanych konstruktów dla celów modyfikacji dystrybucji pęd/korzeń Zn i Cd dla potrzeb biotechnologii (fitoremediacji oraz biofortyfikacji) **jest niska**. Taki wniosek jest uzasadniony tym, że modyfikacja pobierania, akumulacji i tolerancji na Zn i Cd w tytoniu związana z wprowadzeniem AtHMA4-F i jego mutantów jest zależna od stężenia poszczególnych pierwiastków w pożywce. Nieprzewidywalność fenotypu roślin transgeniczych w odniesieniu do np. zmienności warunków glebowych (profilu jonowego roztworu glebowego zależnego od poziomu opadów, zakwaszenia, nawożenia itp.) wyklucza zatem praktyczne zastosowanie badanych konstruktów dla celów biotechnologii.

SPIS LITERATURY:

1. **Adams J. P., Adeli A., Hsu C-Y, Harkess R.L., Page G.P., dePamphilis C.W., Schultz E.B., and Yuceer C.**, 2011 r. "Poplar maintains zinc homeostasis with heavy metal genes *HMA4* and *PCSI*" *J. Exp. Bot.* vol. 62(11): 3737-3752
2. **Antosiewicz D.M., Barabasz A., Siemianowski O.**, 2014 r. „Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes”, *Frontiers in Plant Science* vol. 5:80
3. **Auguy F., Fahr M., Moulin P., Brugel A., Laplace L., Mzibri M.E., Filali-Maltouf A., Doumas P., Smouni A.**, 2013 r. "Lead Tolerance and Accumulation in *Hirschfeldia incana*, a Mediterranean *Brassicaceae* from Metalliferous Mine Spoils". *PLoS ONE* 8(5): e61932. doi:10.1371/journal.pone.0061932
4. **Arrivault S, Senger T, Kramer U** 2006 r. "The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply". *Plant J* 46:861–879
5. **Alloway B. J.** 2008 r. "Zinc in soils and crop nutritions " Second edition, published by IZA and IFA Brussels, Belgium and Paris, France, 2008
6. **Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G.** 2001 r. "Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* 126, 696–706
7. **Barabasz, A., Krämer, U., Hanikenne, M., Rudzka, J., and Antosiewicz, D.M.** 2010 r. Metal accumulation in tobacco expressing *Arabidopsis halleri* metal hyperaccumulation gene depends on external supply. *J. Exp Bot.* 61 : 3057-3067.
8. **Barabasz, A., Mills, R.F., Trojanowska, E., Williams, L.E. and Antosiewicz, D.M.** 2011 r. Expression of *AtECA3* in tobacco modifies its response to manganese, zinc and calcium. *Environ. Exp. Bot.* 72: 202-209.
9. **Barabasz A, Wilkowska A, Ruszczyńska A, Bulska E, Hanikenne M, Czarny M, Krämer U, Antosiewicz DM.** 2012 r. "Metal response of transgenic tomato plants expressing P1B-ATPase", *Physiologia Plantarum* 145: 315–331.
10. **Barabasz A., Wilkowska A., Tracz K., Ruszczyńska A., Bulska E., Mills RF., Williams LE, Antosiewicz DM.**, 2013 r. "Expression of *HvHMA2* in tobacco modifies Zn–Fe–Cd homeostasis." *Journal of Plant Physiology* 170, 1176–1186.
11. **Baekgaard L., Mikkelsen M. D., Sørensen D. M., Hegelund J. N., Persson D. P., Mills R. F., Yang Z., Husted S., Andersen J. P., Buch-Pedersen M. J., Schjoerring J. K., Williams L. E., Palmgren M. G.** 2010 r. "A combined zinc/cadmium sensor and zinc/cadmium export regulator in a heavy metal pump". *J. Biol. Chem.* 285, 31243–31252
12. **Benes, I., Schreiber, K., Ripberger, H. and Kircheiss, A.** 1983 "Metal complex formation of nicotianamine, a possible phytosiderophore." *Experientia*, 39, 261–262

13. **Berezin I., Mizrachy-Dagry T., Brook E., Mizrahi K., Elazar M., Zhuo S., Saul-Tcherkas V., and Shaul O.** 2008 r.. Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size. *Plant Cell Reports* 27: 939–949.
14. **Boerjan W., Ralph J., and Baucher M.,** 2003 r., “Lignin biosynthesis” *Annual Review of Plant Biology* Vol. 54: 519-546
15. **Bond J, Donaldson L, Hill S, Hitchcock K.** 2008 r. “*Safranine fluorescent staining of wood cell walls*. *Biotech Histochem*” 83(3):161-71
16. **Bovet L.; Rossi L.; Lugon-Moulin N.,** 2006 r. “Cadmium partitioning and gene expression studies in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica*” *Physiologia Plantarum* Vol. 128-3
17. **Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A.** 2007. “Zinc in plants”. *New Phytologist* 173: 677–702.
18. **Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, Mari S, Curie C.,** 2010 r. "High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions". *The Plant Cell*. 22, 904–917.
19. **Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M.** 1997 r. “Phytoremediation of soil metals” *Current Opin. Biotechnol.*, 8, pp. 279–284
20. **Cassin G., Mari S., Curie C., Briat J.F. i Czernic P.,** 2009 r. "Increased sensitivity to iron deficiency in *Arabidopsis*.", *Journal of Experimental Botany* 60, 1249–1259.
21. **Claus J., Bohmann A., and Chavarria-Krauser A.,** 2012 r. “Zinc uptake and radial transport in roots of *Arabidopsis thaliana*: a modelling approach to understand accumulation” *Ann Bot* first published online, doi:10.1093/aob/mcs263
22. **Clemens S., Palmgren, M.G. and Krämer, U.** 2002 r. ”A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation.” *Trends Plant Sci.*, 7, 309–315
23. **Clemens S.,** 2006 r. “Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants”, *Biochimie*, Volume 88, Issue 11, Pages 1707-1719
24. **Clemens S. Aarts M.G.M Thomine S. and Verbruggen N.,** 2012 "Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning" *Trends in Plant Science* Vol. 18, No. 2
25. **Colangelo EP oraz Guerinot ML.** 2006 r. “Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants”. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 322–330
26. **Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** 2002 r. ” Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation ” *The Plant Cell* vol. 14:1347-1357
27. **Cosio C., DeSantis L., Frey B., Diallo S. & Keller C.** 2005 r. "Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*.", *Journal of Experimental Botany* vol. 56, 765–775.

28. **Córdoba-Pedregosa MC, González-Reyes JA, Canadillas MS, Navas P, Córdoba F** 1996 r. "Role of apoplastic and cell-wall peroxidase on the stimulation of root elongation by ascorbate". *Plant Physiol* 112: 1119–1125.
29. **Craigon DJ., James N., Okyere J., Higgins J., Jotham J., May S.** 2004 r. "NASCArrays: A repository for Microarray Data generated by NASC's Transcriptomics Service", *Nucleic Acids Research*, volume 32, Database issue D575-D577.
30. **Cunningham SD, Berti WR, Huang JW** 1995 r. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol* 13: 393-397
31. **Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Le Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P., Mari S.** 2009 r. "Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters". *Ann Bot (Lond)* 103: 1–11
32. **DalCorso G., Farinati S., Maistri S., Furini A.,** 2008 r. "How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression" *Journal of Integrative Plant Biology* vol. 50:1268-1280.
33. **Dannel F., Pfeffer H., Marschner H.** 1995 r. Isolation of apoplastic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplastic pH. *J Plant Physiol* 50: 208–213
34. **Davies KL., Davies MS. and Francis S.** 1991 r. Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. *Plant, Cell and Environment* 14, 399-406
35. **Deinlein U., Weber M., Schmidt H., Rensch S., Trampczynska A., Hansen TH., Husted S., Schjoerring JK., Talke IN., Krämer U., Clemens S.,** 2012 r. "Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation". *Plant Cell* 24:708–723
36. **Desbrosses-Fonrouge A.G., Voigt K., Schroder A., Arrivault S., Thomine S., Kramer U.,** 2005 r. "Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation". *FEBS Lett* 579:4165–4174
37. **Donnini S, Dell'Orto M, Zocchi G,** 2011r. "Oxidative stress responses and root lignification induced by changing iron availability in pear and quince genotypes." *Tree Physiology* 31 102–113.
38. **Edwards K.D., Bombarely A., Story G.W., Allen F., Mueller L.A., Coates S.A. and Jones L.** 2010 r. "TobEA: an atlas of tobacco gene expression from seed to senescence", *BMC Genomics*, 11:142 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/142>).
39. **Enomoto Y, Hodoshima H, Shimada H, Shoji K., Yoshihara T., Goto F.** 2007 r. "Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots". *Planta*. vol. 227: 81-89
40. **Enstone DE, Peterson CA. and Ma F.** 2003 r., "Root endodermis and exodermis: structure, function and responses to the environment." *Journal of Plant Growth Regulators* vol. 21, 335 – 351

41. **Fecht-Christoffers M.M., Führs H., Braun H. & Horst W.J.** 2006 r. "The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidase in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance.", *Plant Physiology* vol. 140, 1451–1463
42. **Frausto da Silva J.J.R., Williams R.J.P.** 2001 "The Biological Chemistry of the Elements", second ed Clarendon Press, Oxford
43. **Fernandez-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule A** 2011 r. "Arabidopsis plasmodesmal proteome". *PLoS ONE* 2011, 6:e18880
44. **Gallego S. M., Pena L. B., Barcia R. A., Azpilicueta C. E., Iannone M. F., Rosales E. P., Zawoznik M. S., Groppa M. D., Benavides M. P.**, 2012 r. "Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms", *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 83 pp. 33-46,
45. **Ghasemi R., Ghaderian S.M., Krämer U.**, 2009 "Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*", *New Phytologist* Volume 184, Issue 3, pages 566–580
46. **Graham RD, Welch RM, Saunders DA, Ortiz-Monasterio I, Bouis HE, Bonierbale M, de Haan S, Burgos G, Thiele G, Liria R.** 2007. Nutritious subsistence food systems. *Advances in Agronomy* 92: 1–74.
47. **Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A., Richaud P.** 2004 r., "AtHMA3, a plant P(1B)-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast." *FEBS Lett.* Vol. 561:22-28
48. **Grusak M. A. and Pezeshgi S.** 1996 r. "Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the dgl Mutant of Pea" *Plant Physiology* vol.110 no. 1 329-334
49. **Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerinot M., Eide D.**, 1998 r. "Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (12) (1998) 7220–7224
50. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C.**1990 r. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease—an overview" *Methods Enzymol.*, 186, pp. 1–85
51. **Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D. and Krämer, U.** 2008 r. „Evolution of metal hyperaccumulation required *cis*-regulatory changes and triplication of *HMA4*". *Nature*, 453, 391–395
52. **Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Halima, P., Plessl, M., Peräniemi, S., Schat, H., Aarts, M.C.M., Servomaa, K., Kärenlampi, S.O.** 2007 r. "Isolation of Zn-responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*. *Planta*" 225, 977-9898.
53. **Heidenreich, B., Mayer, K.J., Sandermann, H., Ernst, D.**, 2001 r. "Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure". *Plant Cell Environ.* 24, 1227-1234.
54. **Haydon MJ, Cobbett CS**, 2007 r. A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*". *Plant Physiol* 143 1705–1719

55. **Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette M.-L.M., Magniette S., Cuine P., Auroy P., Richaud C., Forestier J., Bourguignon J.-P., Renou A., Vavasseur N., Leonhardt N.**, 2006 r. "Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots" *Biochimie* vol. 88:1751-1765.
56. **Hodoshima H, Enomoto Y, Shoji K, Shimada H, Goto F, Yoshihara T.** 2008 r. "Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley". *Physiologia Plantarum* vol.129:622-634
57. **Hoffmann L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.**, 2003 r., "Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 95–103
58. **Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer C., Lapierre C., Pollet B. and Legrand M.**, 2004 r., "Silencing of Hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis", *Plant Cell* **16**: 1446–1465
59. **Horsch, R. B.; Fry, J. E.; Hoffmann, N. L.; Eichholtz, D.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T.** Simple and General Method for Transferring Genes into Plants" *Science*, vol. 227:4691 pp. 1229-1231
60. **Huh, S.M., Noh, E.K., Kim, H.G., Jeon, B.W., Bae, K., Hu, H.C., Kwak, J.M., Park, O.K.**, 2010 r. "*Arabidopsis* annexins annAt1 and annAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses". *Plant Cell Physiol.* Vol. **51**: 1499–1514,
61. **Hussain D., Haydon J., Wang Y., Wong E., Sherson S. M., Young J., Camakaris J. Harper J. F. and Cobbett C. S.**, "P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*", *The plant Cell* Vol. 16, 1327-1339, 2004 r.
62. **Jaek E., Dumas B., Geoffroy P., Favet N., Inzé D., Van Montagu M., Fritig B., Legrand M.** 1992 r., "Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of *O*-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus", *Mol Plant-Microbe Interact* 5: 294–300.
63. **Jaek E., Martz F., Stiefel V., Fritig B., Legrand M.**, 1996 r., "Expression of tobacco class I *O*-methyltransferase in healthy and TMV-infected tobacco", *Mol Plant-Microbe Interact* 9: 681–688.
64. **Jaworski K., Świeżawska B., Szmidt-Jaworska A.** 2011. "*Kalmodulina i białka z nią spokrewnione* u roślin". *Postępy Biologii Komórki* 38, 111–128.
65. **Kabata-Pendias A. i H. Pendias.** 1999 r. "Biogeochemia pierwiastków śladowych", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
66. **Kim S., Takahashi M., Higuchi K., Tsunoda K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N. K.**, 2005 r. "Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants", *Plant Cell Physiol.*, vol. 46, 1809-1818.
67. **Korenkov, V., Hirschi, K., Crutchfield, J.D. and Wagner, G.J.** 2007 r. "Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L", *Planta*, 226, 1379–1387

68. **Korenkov V, King B, Hirschi K, Wagner GJ.** 2009 "Root-selective expression of *AtCAX4* and *AtCAX2* results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum L.*" *Plant Biotechnology Journal* vol. 7:219-226
69. **Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** 1999."The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range". *Plant Molecular Biology* vol. 40:37-44
70. **Küpper H., Lombi E., Zhao F.-J., McGrath S.P.** 2000 r. "Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*" *Planta*, Vol 212, 1:75-84
71. **Krzeslowska M., (2011),** "The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy" *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 33:1
72. **Laohavisit, A., Davies, J.M.,** 2011 r., "Annexins", *New Phytol.* Vol **189**: 40–53, 2011
73. **Lee S., Lee E.J., Yang E.J., Lee J.E., Park A.R., Song W.H., Park O.K.** 2004 r. "Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 16:1378-1391
74. **Lewak S., Kopcewicz J.,** 2009 r. „Fizjologia roślin” Wydawnictwo Naukowe PWN. ISBN 978-83-01-15969-6
75. **Li C.** 2008 Automating dChip: toward reproducible sharing of microarray data analysis. *BMC Bioinformatics.*; 9:231.
76. **Li C. and Wong W.H.** 2001 r. "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection", *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 98, 31-36.
77. **Li C. and Wong W.H.** 2003 r. "DNA-Chip Analyzer (dChip). In *The analysis of gene expression data: methods and software*". Edited by G Parmigiani, ES Garrett, R Irizarry and SL Zeger. Springer
78. **Lin YF., Liang HM., Yang SY., Boch A., Clemens S., Chen CC., Wu JF., Huang JL., Yeh KC.** 2009 r. "Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter." *New Phytol* 182:392–404
79. **Lochlainn S.O., Bowen H.C., Fray R.G., Hammond J.P., King G.J., White P.J., Graham N.S., Broadley M.R.,** 2011 r. "Tandem quadruplication of *HMA4* in the zinc and cadmium hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*". *PLoS ONE* 2011;6:e17814
80. **Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K.** 2001 r. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol Plant.* 2001 Apr; 111(4):457-465
81. **López-Millán A-F., Ellis D.R., Grusak M.A.,** 2004 r. "Identification and Characterization of Several New Members of the ZIP Family of Metal Ion Transporters in *Medicago truncatula*" *Plant Molecular Biology* vol 54. pp. 583-596

82. **Lux, M. Martinka, M. Vaculik, P. J. White** 2011 r., "Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review". *Journal of Experimental Botany* , vol. 62 (1), 21 - 37
83. **Lux A, Morita S, Abe J, Ito K.** 2005 r. An improved method for clearing and staining free-hand sections and whole-mount samples. *Ann Bot. Nov*; vol. 96(6):989-96
84. **Menguer P.K., Farthing E., Kerry A., Peaston K.A., Ricachenevsky F.K., Fett J.P., Williams L.E.** 2013 r. "Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1", *Journal of Experimental Botany* vol. 64, 2871–2883
85. **Mills RF, Valdes B, Duke M, Peaston KA, Lahner B, Salt D.E., Williams L.E.,** 2010 r. "Functional Significance of AtHMA4 C-Terminal Domain *In Planta* Functional Significance of AtHMA4 C-Terminal Domain *In Planta*". *PLoS ONE* 5(10): e13388. doi:10.1371/journal.pone.0013388
86. **Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., and Williams, L.E.** 2003 r. "Functional expression of AtHMA4, a P-1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass", *Plant J.* 35, 164–176.
87. **Mills, R.F., Francinim, A., Pedro S.C. Rocha, F., Baccarini P.J., Aylett M., Krijger, G.C., Williams, L.E.,** 2005 r. "The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels" *FEBS Letters*, vol. 579:3 pp. 783–791
88. **Milner M.J., Seamon J., Craft E., and Kochian L.V.** 2013 r. "Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis" *J. Exp. Bot.* (2013) 64(1): 369-381
89. **Morel, M., Crouzet, J., and Gravot, A.,** 2009 r. "AtHMA3, a P1B ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, 2009, vol. 149, pp. 894–904.
90. **van de Mortel JE, Schat H, Moerland PD, Ver Loren van Themaat E, Van Der Ent S, Blankestijn H, Ghandilyan A, Tsiatsiani S, Aarts MGM,** 2008 r. "Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* vol. 31:301-324
91. **Mühling K. H. & Läuchli A.** 2003 r. "Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance", *Plant and Soil* 253: 219–231,.
92. **Sasaki A., Yamaji N., Yokosho K., Ma J.F.** 2012 r. "Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice." *Plant Cell* vol. 24:2155-2167
93. **Shaul O., Hilgemann D.W., Almeida-Engler J., Van Montagu M., Inzé D., Galili G.,** 1999 r. "Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger". *EMBO* vol. 18, pp. 3973–3980
94. **Seals, D.F., Randall, S.K.** 1997 r. "A vacuole-associated annexin protein, VCaB42, correlates with the expansion of tobacco cells". *Plant Physiol.* vol 115: pp 753–761,

95. **Shanmugam V., Lo J-C., Wu C-L., Wang S-L., Lai C-C., Connolly E.L., Huang J-L., Yeh K-C.** 2011 r. "Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*—the role in zinc tolerance", *New Phytol* vol. 190:125–137
96. **Stephan, U.W. i Scholz, G.** 1993, "Nicotianamine – mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem." *Physiol. Plant.* vol. 88, 522–529
97. **Olesen C, Picard M, Winther AM Gyrrup, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Moller, J. V. and Nissen, P.,** 2007 r., "The structural basis of calcium transport by the calcium pump". *Nature* **450** 1036-1042
98. **Palmer CM i Guerinot ML.** 2009 r. "Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants", *Nature Chemical Biology* 5, 333-340.
99. **Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D.** 2008 r. "Zinc biofortification of cereals: problems and solutions", *Trends in Plant Science* 13: 464–473.
100. **Passardi F., Penel C., Dunand C.,** 2004 r. "Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall", *Trends in Plant Science*, Vol. 9:11
101. **Papoyan A i Kochian LV** 2004 r. "Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase." *Plant Physiology* 136:3814–3823.
102. **Park, J., Song, W-Y., Ko, D, Eom, Y., Hansen, T., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E. and Lee, Y.** 2012 r. "The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury", *Plant J.* 69, 278-288
103. **Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV.** 2000 r. "The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 4956–4960
104. **Pelloux, J., Rustérucci, C. And Mellerowicz, E.J.,** 2007 r. "New insights into pectin methylesterase structure and function". *Trends Plant Sci* 12, 267-277.
105. **Pirck M, Hirt H, Heberle-Bors E.,** 1994 r. "The cDNA sequence encoding an annexin from *Medicago sativa*". *Plant Physiology* vol. 104 pp. 1463 – 1464.
106. **Ramesh SA., Choimes S., Schachtman DP.** "Over-Expression of an *Arabidopsis* Zinc Transporter in *Hordeum Vulgare* Increases Short-Term Zinc Uptake after Zinc Deprivation and Seed Zinc Content" 2004 r., *Plant Molecular Biology* Vol. 54, 3:373-385
107. **Rout G.R. i Das P.** 2003 r. "Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism" *Agronomie* 23:3–11
108. **Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L., Guerinot M.L.,** 1999 r. "A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils", *Nature* 397 (6721) (Feb. 1999) 694–697

109. **Shufflebottom D, Edwards K, Schuch W, Bevan M.** 1993 r. "Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns." *Plant Journal* 3, 835-845
110. **Sano T., Yoshihara T., Handa K., Sato M.H., Nagata T. and Hasezawa S.,** 2012 r. "Metal Ion Homeostasis Mediated by NRAMP Transporters in Plant Cells – Focused on Increased Resistance to Iron and Cadmium Ion" *Crosstalk and Integration of Membrane Trafficking Pathways*
Dr. Roberto Weigert (Ed.), ISBN: 978-953-51-0515-2, InTech
111. **Sanità di Toppi L, Gabbrielli R.** 1999 r. "Response to cadmium in higher plants." *Environmental and Experimental Botany* vol. 41:105-130
112. **Salt D.E., Baxter I., and Lahner B.** 2008 r. "Ionomics and the Study of the Plant Ionome" *Annual Review of Plant Biology* Vol. 59: 709-733
113. **Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.,** 1989 r. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
114. **Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J** 1999 r. "Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany* vol. 50:1267-1280
115. **Shigaki T., Hirschi K. D.** 2006 r. "Diverse Functions and Molecular Properties Emerging for CAX Cation/H⁺ Exchangers in Plants" *Plant Biology* Vol. 8:4, pp 419–429
116. **Siefritz F., Tyree MT., Lovisolo C., Schubert A. & Kaldenhoff R.** 2002 r. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14, 869-876.
117. **Sinclair SA, Krämer U.** 2012 r. "The zinc homeostasis network of land plants". *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823:1553-67;
118. **Sinclair S. A., Sherson S.M., Jarvis R., Camakaris J., Cobbett C.S.** 2007 r. "The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in Arabidopsis roots." *New Phytologist* 174, 39-45.
119. **Sparkes I.A., Runions J., Kearns A., Hawes C.,** 2006 r. "Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants." *Nat Protocols* 1: 2019–2025
120. **Spurr, A. R.** 1969 r. "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy" *Journal of ultrastructure research* vol. 26, p 31-43
121. **Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., and Nishizawa N. K.** 2003 r. "Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development" *Plant Cell* vol. 15: 1263-1280.
122. **Tan J., Wang J., Chai T., Zhang Y., Feng S., Li Y., Zhao H., Liu H. and Chai X.** 2013 r. "Functional analyses of TaHMA2, a P_{1B}-type ATPase in wheat", *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 11:4, pp 420–431

123. **Tuomainen M, Tervahauta A, Hassinen V, Schat H, Koistinen KM, Lehesranta S, Rantalainen K, Häyriinen J, Auriola S, Anttonen M.** 2010 r. "Proteomics of *Thlaspi caerulescens* accessions and an inter-accession cross segregating for zinc accumulation", *Journal of Experimental Botany* Vol. 61: 1075–1087
124. **Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H.** 2003 r. "AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency". *Plant Journal* 34: 685–695.
125. **Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge DB.,** 1997 r. "Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction." *Plant J* vol. 11:1187–1194.
126. **Tramczynska A, Küpper H, Meyer-Klaucke W, Schmidt H, Clemens S** 2010 r. "Nicotianamine forms complexes with Zn (II) in vivo." *Metallomics* 2(1):57–66
127. **Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. and Richaud, P.** 2004 r. "Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance". *FEBS Lett.* **576**, 306-312.
128. **Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A. and Richaud, P.** 2005 r. "Heavy metal transport by *AtHMA4* involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His stretch", *FEBS Lett.* **579**, 1515-1522.
129. **Whetten R W, Sederoff R R** 1995 "Lignin biosynthesis" *Plant Cell* Vol. 7:1001–1013
130. **Welch RM, Graham RD.** 2002. Breeding crops for enhanced micronutrient content. *Plant and Soil* 245: 205–214.
131. **Welch RM, Graham RD.** 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55: 353–364.
132. **WHO**, Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Diseases Attributable to Selected Major Risk Factors, vol. 1–3, Organizacion Mundial de la Salud, 2005
133. **White PJ** 2012 r. "Ion Uptake Mechanisms of Individual Cells and Roots: Short-distance Transport" rozdział 2 książki "Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants" (Third Edition, 2012) pod redakcją Petra Marschnera ISBN: 978-0-12-384905-2
134. **White PJ, Broadley MR.** 2005. "Biofortifying crops with essential mineral elements". *Trends in Plant Science* 10: 586–593.
135. **White PJ, Broadley MR** 2009 r. "Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine". *New Phytologist* 182, 49-84
136. **White PJ, Whiting SN, Baker AJM, Broadley MR.** 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytologist* 153: 201–207.
137. **Williams, L.E., Pittman, J.K. and Hall, J.L.** 2000 r. "Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants", *Bioch. Bioph. Acta*, **1465**, 104-126.

138. **Williams, L.E. i Mills, R.F.** 2005 r. "P_{1B}-ATPase – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants", *Trends Plant Sci* **10**, 491-502.
139. **Wójcik P., Tomaszewska B.** 2005 r. "Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych", *Biotechnologia*, 4, 71, 158-173
140. **van Belleghem F., Cuypers A., Semane B., Smeets K., Vangronsveld J., D'Haen J., Valcke R.,** 2007 r. "Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*" *New Phytologist* Vol. 173:3, pp. 495–508,
141. **van der Zaal B.J., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Chardonens A.N., Schat H., Verkleij J.A.C.** 1999 r. "Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation". *Plant Physiol.* 119:1047–1055.
142. **von Wirén N, Marschner H, Römheld V.** 1996 r. „Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc". *Plant Physiology* 111: 1119–1125.
143. **Wong C.K.E. i Cobbett C.S.,** 2008 r. "HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*." *New Phytologist* vol. 181: 71–78
144. **Wojas S., Clemens S., Hennig J., Skłodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W. and Antosiewicz DM.,** 2008 r. "Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium" *J. Exp. Bot.* vol. 59 (8): 2205-2219
145. **Wojas S., Hennig J., Plaza S., Geisler M., Siemianowski O., Skłodowska A., Ruszczyńska A., Bulska E. & Antosiewicz D.M.** 2009 r. "Ectopic expression of *Arabidopsis* ABC transporter *MRP7* modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation". *Environmental Pollution* **157**, 2781-2789
146. **Xiong J, Lu H, Lu K, Duan Y, An L, Zhu C,** 2009 r. "Cadmium decreases crown root number by decreasing endogenous nitric oxide, which is indispensable for crown root primordia initiation in rice seedlings." *Planta* vol. 230:599-610
147. **Xue Y.J., Tao L., and Yang Z.M.** 2008 r. "Aluminum-Induced Cell Wall Peroxidase Activity and Lignin Synthesis Are Differentially Regulated by Jasmonate and Nitric Oxide" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (20), 9676-9684
148. **Zhao C-R, Ikka T, Sawaki Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Hibino T, Sato S, Sakurai N, Shibata D, Koyama H.** 2009 r. "Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*" *BMC Plant Biology* vol. 9:32
149. **Zorrig, W., Abdelly, C. and Berthomieu, P.** 2011 r. "The phylogenetic tree gathering the plant Zn/Cd/Pb/Co P_{1B}-ATPases appears to be structured according to the botanical families" *C. R. Biol.* 334, 863–871.

Spis publikacji (prace nr 2, 3, 4 zawierają wyniki mojej pracy doktorskiej):

1. Wojas S., Hennig J., Plaza S., Geisler M., **Siemianowski O.**, Skłodowska A., Ruszczyńska A., Bulska E., Antosiewicz D.M. "Ectopic expression of *Arabidopsis* ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation" 2009 r. Environmental pollution vol. 157, 10: 2781-2789 [IF=3,902]
2. **Siemianowski O.**, Mills RF, Williams LE and Antosiewicz DM, 2011 r. Expression of the P_{1B}-type ATPase *AtHMA4* in tobacco modifies Zn and Cd root to shoot partitioning and metal tolerance. Plant Biotechnol. Journ. 9: 64-74 [IF= 6,279].
3. **Siemianowski O.**, Barabasz A, Weremczuk A, Ruszczyńska A, Bulska E, Williams LE and Antosiewicz DM. 2013 r. Development of Zn-related necrosis In tobacco is enhanced by expressing *AtHMA4* and depends on the apoplastic Zn levels. Plant Cell and Environment. 36: 1093-1104 [IF =5,906]
4. **Siemianowski O.**, Barabasz A., Kendziorek M., Ruszczyńska A., Bulska E., Williams LE and Antosiewicz D.M. 2014 r. "*AtHMA4* expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier" Journal of Experimental Botany doi: 10.1093/jxb/ert471 [IF = 5,794]
5. Danuta M. Antosiewicz, Anna Barabasz, **Oskar Siemianowski** „Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes” 2014 r., Frontiers in Plant Science vol. 5:80. [IF=3,637]

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została zaprezentowana w formie doniesień konferencyjnych:

- Kraków 16-19.09.2009 „Ecophysiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors”, w formie **prezentacji ustna**

Przyznano drugie miejsce w konkursie na najlepszą prezentację młodych naukowców

- Ascona, Szwajcaria, 11-16.10.2009, COST 859 Final Conference: „Phytotechnologies to Promote Sustainable Land Use and Improve Food Safety”, w formie **prezentacji ustnej**

Przyznana nagroda za najlepszą prezentację młodych naukowców

- Valencia, Hiszpania, 4-9.07.2010, XVII Congress of the FESPB, w formie **prezentacja ustna**
- Hannover, Niemcy 30.09-02.10 2010 “International Plant Nutrition seminary”, w formie **plakatu**

- Brussel, Belgia, 1-3.02 2011 “**PHIME** (Public health impact of long-term, low-level mixed element exposure in susceptible population strata) annual meeting”, w formie **prezentacji ustnej**
- Murcia, Spain, 25- 27.05 2011, “3rd International Symposium on Trace Elements and Health”, w formie **prezentacji ustnej**
- Gdańsk, Poland, 5-8.09.2011, „The International Conference of Environmental (Bio)Technologies” w formie **plakatu**
- Lisbon, Portugal, “Enhanced Nutritional Value of Plant-Derived Food or Feed” 23-26.10.2012, w formie **prezentacji wyników**

Badania przedstawione w pracy zostały sfinansowane ze środków Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin UW oraz w ramach:

- **Grant 6PRUE PHIME** (Public Health Impact of long-term, low level Mixed Element exposure in susceptible population strata) kierownik D. M. Antosiewicz.
- 3 miesięcznego **stażu** na Uniwersytecie w Hasselt, Belgia w programie COST STSM (Short Term Scientific Mission) nr ref: COST-STSM-859-04650 (kierownik: O. Siemianowski),
- **grantu na „Badania Własne”** nr: 191128, (kierownik: O. Siemianowski),
- **grantu NCN Preludium** nr UMO-2011/01/N/NZ2/06406 (kierownik: O. Siemianowski)
- badania zakończono raportem oraz publikacją: Siemianowski O., Barabasz A., Kendziorek M., Ruszczyńska A., Bulska E., Williams LE and Antosiewicz D.M. 2014 r. "AtHMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier Journal of experimental botany" doi: 10.1093/jxb/ert471

W ramach pracy doktorskiej wykorzystano:

- Rośliny transformowane genami *AtHMA4-F*, *AtHMA4-C*, *AtHMA4-T*, których transformację wykonała w ramach Grantu PHIME **p. Agnieszka Godoń**, Uniwersytet Warszawski.
- Konstrukty *AtHMA4-F:GFP* wykonany przez **p. dr L. Williams i p. dr R. Mills**, Uniwersytet w Southampton.
- Konstrukty *AtHMA4-C:GFP* wykonany przez **p. dr Sylwię Wojaś**, Uniwersytet Warszawski.

Badania w ramach pracy doktorskiej prowadzone poza Zakładem Anatomii i Cytologii Roślin:

- Badania z użyciem mikroskopu elektronowego, wykonane samodzielnie w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Instytut Nenckiego kierowanym przez **prof. Elżbietę Wyrobę**.
- Badania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, wykonane samodzielnie w Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, przy udziale pana **dr. Bohdana Paterczyka**.
- Przygotowanie próbek metodami mroźniowymi w ramach grantu dopełniającego 7 program ramowy UE - COST 859 („*Phytotechnologies to promote sustainable land use management and improve food chain safety*”) - grant nr COST-STSM-859-04650, rok 2009). Badania wykonane samodzielnie, w ramach napisanego i realizowanego przeze mnie grantu odbywały się w Uniwersytecie Hasselt (Zakład **prof. Jaco Vangronsvelda**), Uniwersytecie w Gendawie (pod kierunkiem **dr Myriam Claeys**) oraz Uniwersyteckim Centrum Medycznym (pod kierunkiem **dr Georga Posthumy**).
- Badania mikromacierzowe (hybrydyzacja, przygotowanie mikromacierzy, odczyt) wykonane na zlecenie przez Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), School of Biosciences University of Nottingham United Kingdom.

W ramach realizacji badań wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej wykonano:

- **pracę licencjacką, A. Weremczuk** „Lokalizacja cynku w korzeniach tytoniu z ekspresją AtHMA4 i AtHMA4-Cterm w warunkach wysokiego stężenia (100 μ M) cynku w pożywce” 2011 r.,
- **pracę magisterską T. Pietrzyk** „Poszukiwanie mechanizmów obniżonej akumulacji Cd przez rośliny tytoniu z ekspresją AtHMA4” 2013 r.

Nagrody zespołowe:

Jako członek zespołu p. prof. D. M. Antosiewicz - Nagrody Rektora za rok 2011, 2013 i 2014.

Stypendia:

- Program stypendialny dla najlepszych uczestników studiów doktoranckich i młodych doktorów UW
- II edycja (2010 r.)